BEITRÄGE ZUR MORPHOLOGIE UND PHYSIOLOGIE VON BAKTERIENKOLONIEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GATTUNG BACILLUS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainer Marwitz

aus Leipzig

1970

BEITRÄGE ZUR MORPHOLOGIE UND PHYSIOLOGIE VON BAKTERIENKOLONIEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GATTUNG BACILLUS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainer Marwitz

aus Leipzig

1. Referent: Professor Dr. Theo Eckardt
2. Referent: Professor Dr. Georg Henneberg
Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1970

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINFÜHRUNG	5
2.	LITERATURÜBERSICHT	6
2.1	Allgemeines	6
2.2	Morphologie und Feinstruktur von Bakterienkolonien	8
2.3	Entwicklung und Entwicklungsmechanismen von Bakterienkolonien	14
2.4	Einflüsse innerer und äußerer Faktoren auf Koloniemorphologie und Feinstruktur	14
2.5	Die Bakterienkolonie als biologische Einheit	15
3.	FRAGESTELLUNG	17
4.	MATERIAL UND METHODEN	19
5.	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	26
5.1	Allgemeines	26
5.2	Bacillus subtilis	28
5.2.1	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar	28
5.2.2	Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar	37
5.2.3	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar + 1,0 γ Chloramphenicol/ml	41
5.3	Bacillus pumilus	44
5.3.1	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar	44
5.3.2	Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar	51
5.3.3	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar + 1,0 γ Chloramphenicol/ml	53
5.3.4	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar + 5 I.E. Penicillin/ml	55
5.4	Bacillus cereus	56
5.4.1	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar	56
5.4.2	Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar	59
5.4.3	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar + 1,0 γ Chloramphenicol/ml	62
5.4.4	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar + 1 I.E. Penicillin/ml	64

		Seite
5.5	Bacillus cereus (Glatt-Variante)	67
5.5.1	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar	67
5.5.2	Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar	77
5.6	Bacillus mycoides	81
5.6.1	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar	81
5.6.1.1	Wachstum bei Zimmertemperatur	81
5.6.1.2	Wachstum bei + 37° C	85
5.6.2	Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar	89
5.6.2.1	Wachstum bei Zimmertemperatur	89
5.6.2.2	Wachstum bei + 37° C	94
5.6.3	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar + 1 I.E. Penicillin/ml	98
5.7	Bacillus polymyxa	99
5.7.1	Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar	99
5.7.2	Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar	103
6.	DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	108
6.1	Erhaltungszustand und Qualität der Schnittpräparate	108
6.2	Vergleichende Kolonieentwicklung und Mechanismus der Kolonieentwicklung	115
6.2.1	Mikrokolonie-Entwicklung	115
6.2.2	Makrokolonie-Entwicklung	126
6.3	Sporenbildung	151
6.4	Sekundärwachstum	161
6.5	Variabilität	176
6.6	Die Bakterienkolonie als biologische Einheit	197
7.	ZUSAMMENFASSUNG	205
8.	LITERATURVERZEICHNIS	208

1. EINFÜHRUNG

Als Bakterienkolonien werden makroskopisch sichtbare Anhäufungen von Bakterienzellen bezeichnet, die miteinander in Kontakt bleiben und aus einer bis zu vielen Zellen auf der Oberfläche feuchter, nährstoffhaltiger Substrate oder in diesen gewachsen sind. Bakterienkolonien kommen unter günstigen Umweltbedingungen auch in der Natur vor. Sie sind der Menschheit ohne Wissen um die Zusammenhänge bereits seit langem bekannt (MÜLLER 1950) z.B. in Form rotgefärbter Kolonien des "Wunderbakteriums" Serratia marcescens, das auf stärkehaltigen Speisen, Brot und Hostien zu wachsen vermag und in früheren Zeiten zu abergläubischen Deutungen Anlaß gab.

Die enormen Fortschritte der Bakteriologie von der Mitte des vorigen Jahrhunderts an erforderten neue Kultivierungsmethoden für Bakterien und andere Mikroorganismen, die bis dahin zumeist in Flüssigkeiten gehalten wurden. COHN soll zuerst Bakterien in Form von Kolonien auf sterilen Kartoffelscheiben und damit einem festen Substrat gezüchtet haben. Einen äußerst wichtigen Beitrag zur Kultivierung von Bakterien und anderen Mikroorganismen leistete R. KOCH 1881 mit der Einführung fester "Nährböden" in die bakteriologische Praxis durch Verfestigung flüssiger Nährmedien mit Gelatine. Diese Methode wurde durch die Verwendung von Agar-Agar an Stelle von Gelatine vervollkommnet, so daß ohne Veränderung des Nährbodens nun auch die für die Kultur menschenpathogener Keime wichtige Bebrütung bei höheren Temperaturen möglich war.

Auf agarhaltigen Nährböden konnten mit Hilfe von Verdünnungsmethoden verschiedenster Art, am einfachsten durch fraktionierte Aussaat mit der Impföse, "Reinkulturen" der einzelnen Bakterienarten in Form von Einzelkolonien erhalten werden. Da sich die Kolonien der einzelnen Species in zahlreichen Merkmalen wie Farbe, Opakität, Konsistenz, Rand- und Oberflächengestaltung usw. voneinander unterscheiden, die bedingt spezi-

fisch sind, stellt diese Art der Kultivierung fast unverändert bis zum heutigen Tage die Grundlage vieler wissenschaftlicher wie praktischer bakteriologischer Untersuchungen dar, so daß den Bakterienkolonien erhebliche Bedeutung zukommt. Auch als Objekte für morphologische und physiologische Studien sind sie von allgemein-biologischem Interesse.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Allgemeines

2.1.1 Einleitung

Die leichte Kultivierungsmöglichkeit vieler Bakterienspecies nach der Einführung fester Nährböden in die bakteriologische Praxis legte es nahe, sich nicht nur der Bakterienkolonien für Reinkulturzwecke zu bedienen, sondern auch Untersuchungen an diesen selbst, ihrer Morphologie und dem inneren Aufbau durchzuführen. Der Begriff "Kolonie" für distinktes Bakterienwachstum auf festen Substraten soll zuerst von KLEBS 1873 eingeführt worden sein (MÜLLER 1950). Zu dieser Zeit bezeichneten aber die meisten Autoren diese Wuchsart zumeist als "Zoogloeen" (COHN 1881; ZOPF 1883). Die ersten Untersuchungen über die Feinstruktur von Bakterienansammlungen erfolgten auch nicht an Kolonien selbst, sondern an Stichkulturen in Gelatine oder Agar mit aus der Histologie entlehnten Methoden, indem diese gehärtet, eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten wurden (FISCHL 1887; NEISSER 1888; SAUL 1900). Um die Jahrhundertwende setzte sich der Begriff "Bakterienkolonie" allmählich durch, und die weiteren Untersuchungen wurden hauptsächlich an diesen durchgeführt (z. B. SAUL 1905).

2.1.2 Bakterienkolonien auf künstlichen und natürlichen Substraten

Es werden unterschiedliche Arten von Bakterienkolonien unterschieden.

Das Wachstum auf feuchten und nährstoffhaltigen Oberflächen wird als "Oberflächenkolonie" bezeichnet, und auf diese beziehen sich die meisten Untersuchungen. Werden Petrischalen nur auf einer oder wenigen Stellen in großem Abstand voneinander punktförmig mit einer größeren Menge von Impfmaterial beimpft, so entstehen sog. "Riesenkolonien" (PEROLD 1909; BENECKE 1912; JANKE 1916), die sich wegen der fehlenden Hemmung durch benachbarte Kolonien stärker als bei dichter Anordnung ausbreiten. Ein Phänomen besonderer Art bei Oberflächenkolonien der Bacillus circulans-Gruppe ist deren Rotation bzw. Fortbewegung auf dem Substrat als geordnetes Ganzes.

Von Oberflächenkolonien können auch aktiv oder durch Eindrücken von Zellen bei der Beimpfung in Nährbodenunebenheiten Teile in das Substrat einwachsen (LEWICKI 1958; HENNEBERG u. WOLFF 1963). Diese Erscheinung wird vielfältig bezeichnet ("Verwurzelung" usf.) und sollte unter dem Begriff "Tiefenwachstum" von "Oberflächenwachstum" bei Oberflächenkolonien abgegrenzt werden.

Wird verflüssigter Gelatine- oder Agarnährboden mit Bakterien vermischt und in Petrischalen ausgegossen (sog. "Plattenguß), so wachsen nach dem Erstarren des Nährbodens der größte Teil der Kolonien allseits von diesem umgeben in dessen Innern. Durch die Dichte des Mediums wird die Ausdehnung der wachsenden Kolonien gehemmt, so daß besondere, meist linsenartige Formen entstehen, die als "Tiefenkolonien" bezeichnet werden (ORSOS 1910) und von Tiefenwachstum zu unterscheiden sind.

Oberflächenkolonien kommen für Bakterien unter günstigen Umweltbedingungen auch in der Natur vor (BISSET 1955) wie z. B. auf Schleimflüssen von Bäumen (HENNEBERG 1957, 1963). Tiefenkolonien entsprechende Aggregationen sind in vielfältiger Form ("Glomeruli") in Böden gefunden worden (z. B. WINOGRADSKY 1925; CHOLODNY 1930; nach

THIMANN 1964).

2.2. Morphologie und Feinstruktur von Bakterienkolonien

2.2.1 Morphologie

Der makroskopische Aufbau von Bakterienkolonien ist im allgemeinen relativ leicht mit dem unbewaffneten Auge oder bei Lupenvergrößerung zu studieren. Durch vielfach auffällige Farbe der Kolonien haben diese frühzeitig die Aufmerksamkeit von Laien wie Wissenschaftlern auf sich gezogen (KRASSILNIKOV 1959). Die Farbe kann durch Umwandlung von Nährbodenbestandteilen (Indikatornährböden) entstehen, stellt aber meist eine Eigenschaft der Zellen selbst dar (z.B. Serratia marcescens), wobei Farbstoff auch als Stoffwechselprodukt in das Substrat abgegeben werden kann (z.B. Pseudomonas aeruginosa).

Makroskopisch sind weiterhin vor allem der Kolonieumriß, das Verhältnis von Flächen- und Höhenausdehnung und die Strukturierung der Oberfläche und des Randes charakteristisch. Die Form vieler Bakterienkolonien entspricht etwa, vielfältig modifiziert, einer Kugelkappe ("kalottenförmig" nach GILLERT 1963) und ist annähernd radiärsymmetrisch als Folge des zentrifugalen Wachstums von einem Initialpunkt aus bei etwa gleichartigen Umweltbedingungen auf der glatten Nährbodenoberfläche.

Unter gleichen Kulturbedingungen gewachsene Bakterienkolonien sind bedingt art- oder formspezifisch. An Hand ihrer Merkmale kann der "gewiegte Bakteriologe" (BENECKE 1912) bei kritischer Betrachtungsweise bestimmte Formen identifizieren und Abweichungen von der Norm erkennen. Zumindest ist vielfach die Zugehörigkeit zu bestimmten Verwandtschaftsgruppen an Hand von Koloniemerkmalen wie z.B. für Actinomycetales incl. Mycobacterium oder Kokken auszumachen, was auch für einzelne Species wie Bacillus mycoides in der Rauhform zutrifft.

2.2.2 Feinstruktur

Unter der Feinstruktur von Bakterienkolonien werden die mikroskopisch erkennbaren Einzelheiten des Kolonieaufbaues auf der Basis von Zellen und Zellverbänden und deren Lagerung und Anordnung verstanden.

2.2.2.1 Zur Untersuchung der Feinstruktur bieten sich verschiedene Methoden unterschiedlicher Eignung an. Am einfachsten, aber zugleich am wenigsten geeignet ist die vorsichtige Entnahme von Koloniematerial mit der Öse oder Nadel zur Anfertigung von Präparaten. Diese kann besonders für die Untersuchung sehr kleiner abweichender Kolonieteile wie Sekundärkolonien dienlich sein (PREISZ 1904). Weitaus bessere Resultate, bei der die natürliche Anordnung der Bauelemente eher erhalten bleibt, liefern Klatschpräparate, die durch Auflegen von Deckgläsern oder Objektträgern abdruckartige Bilder der Kolonieoberfläche ergeben (BISSET 1955) und früher häufig hergestellt wurden (z.B. FRAENKEL u. PFEIFFER 1895).

Die beste Methode, um Einblicke in die Feinstruktur von Bakterienkolonien zu erhalten, besteht in der Anfertigung von Schnittpräparaten.

Schnitt-Technik. Bakterienkolonien fehlt zumeist der Zusammenhalt der Zellen untereinander, wie er für pflanzliche Gewebe besteht, und leicht erfolgt ein Ablösen vom Substrat. Deshalb bestehen Schwierigkeiten bei der Einbettung der Kolonien, und Methoden, die bei einem Autor erfolgreich waren, versagen u.U. bei anderen (HUTCHINSON 1907; ZOSEL 1922; BINGEL 1947; STÖSS 1955).

Zum Schutz der Kolonien bei der weiteren Behandlung bewährte sich eine Überschichtung mit flüssigem Agar, die zuerst von HUTCHINSON (1907) praktiziert wurde und durch Beifügung von Formalin zugleich der Fixation diente. Die Fixation wird sonst üblicherweise mit oder ohne Überschichtung nach Herausschneiden eines Agarblockes mit der betreffenden Kolonie getrennt durchgeführt. Es bewährten sich Fixationsmittel wie Formalin (PICK 1900; BAYER 1921), Äthanol (MASSINI 1907), Äthanol + Formalin (BINGEL 1947; STÖSS 1955) oder Susa (LEWICKI 1958).
Die Entwässerung der Blöckchen erfolgte ebenfalls auf herkömmliche Weise mit Äthanol. Einige Autoren verzichteten auch auf eine eigentliche Einbettung und härteten lediglich die Gelatine- oder Agarblöckchen mit

den Objekten durch Kaliumbichromat und Äthanol (NEISSER 1888) oder Formalin und Äthanol (PICK 1900, ZOSEL 1922), so daß diese ohne weitere Behandlung geschnitten werden können. Möglicherweise besteht ein Grund zu Mißerfolgen darin, daß neben der Entwässerung vor der Einbettung die Objekte zusätzlich noch gehärtet wurden (HUTCHINSON 1907), was eine überflüssige Schädigung bedeuten kann.
Zur Einbettung wurden mit Erfolg benutzt Celloidin bzw. Celloidin und Paraffin (PICK 1900; SAUL 1900; LEWICKI 1958), Paraffin (MASSINI 1907; LEGROUX u. MAGROU 1920; KAHN u. NONIDEZ 1936), evakuiertes Paraffin-Wachs-Gemisch (STÖSS 1955; STUNKAT 1961), Celodal (BINGEL 1947) und Cremolan (STÖSS 1955). Cremolan ermöglicht es, in wässeriger Lösung zu arbeiten und so den Einfluß von Alkohol auszuschließen. Das Schneiden der eingebetteten Kolonien ist mit normalen Mikrotomen möglich. Die Schnittebene soll dabei senkrecht zur Nährbodenoberfläche stehen und durch das Koloniezentrum gehen. Derartige "Vertikalschnitte" (KAHN u. NONIDEZ 1936) ("Sagittalschnitte" nach STÖSS 1955) erwiesen sich allein als brauchbar und lassen bei der mehr oder weniger ausgeprägten Radiärsymmetrie der Bakterienkolonien einen Schluß auf den Aufbau der gesamten Kolonie zu. Schnittdicken von 6 - 8 µ bei vielen älteren Untersuchungen (z. B. MASSINI 1907) sind zum Erkennen von zellulären Einzelheiten wenig geeignet. Die optimale Schnittdicke ist vom jeweiligen Objekt abhängig und dürfte durchschnittlich bei 2 µ liegen. Günstig für die Gewinnung dünner Schnitte erwies sich eine gute Kühlung (STUNKAT 1961).
Schnittpräparate von Bakterienkolonien können auch ohne Fixation und Einbettung durch Einfrieren und Schneiden mit Kryostaten (SCHÄFER u. DITTES 1959) erhalten werden, der gewöhnlichen Gefriermikrotomen überlegen ist (PICK 1900; BOGGS u. PINCOFFS 1915; KAHN u. NONIDEZ 1936). So empfehlenswert Gefrierschnitte wegen des Fehlens von Schädigungen durch Fixations-, Entwässerungs- und Einbettungsmittel scheinen, erwiesen sie sich bislang für detaillierte Aussagen als zu dick.
Die Anfärbung der Präparate bereitet mit den gebräuchlichen histologischen und bakteriologischen Färbemethoden im allgemeinen keine Schwierigkeiten (NEISSER 1888; PICK 1900; HUTCHINSON 1907; STÖSS 1955).
Bei den bisher beschriebenen Methoden zur Untersuchung von Bakterienkolonien handelt es sich um solche, die mit erheblichen Eingriffen verbunden sind und eine Abtötung der Zellen bedingen. Es ist aber auch möglich, Einblicke in den Aufbau von Bakterienkolonien und vor allem deren Entwicklung durch Lebendbeobachtung zu erhalten. Die direkte mikroskopische Betrachtung ist erfolgreich vor allem für junge Koloniestadien (Mikrokolonien) auf durchscheinenden Substraten in den üblichen Petrischalen (PRINGSHEIM 1918; SCHUBERT 1920; BAYER 1921; PRINGSHEIM u. LANGER 1924) oder durch besondere Verfahren der Kultur auf dünnen Agarschichten in kleinen feuchten Kammern auf dem Objektträger selbst (SCHUBERT 1920; FORTNER 1930, 1951; ULBRICH 1954, 1955). Die Kolonien können dabei mit Tusche (SCHUBERT 1920), Vitalfarbstoffen (ULBRICH 1957) oder Fluoreszenzfarbstoffen (SCHARIKOWA et al. 1966) besser sichtbar werden. Während diese Untersuchungen mit

dem normalen Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop erfolgten, läßt sich nach GILLERT (1963) auch das Polarisationsmikroskop mit Erfolg einsetzen.

2.2.2.2 Einzelheiten der Feinstruktur von Bakterienkolonien.

Nachdem die technisch-methodischen Voraussetzungen für die Untersuchung der Feinstruktur von Bakterienkolonien im Schnitt geschaffen worden waren und mit der umfassenden Arbeit von HUTCHINSON (1907) der Beginn einer wissenschaftlich-kritischen Betrachtungsweise erfolgte, verwundert es, daß späterhin nur noch sporadisch Untersuchungen zu dieser Thematik erfolgten.
Umfassendere Arbeiten über Bakterienkolonien im Schnitt wurden veröffentlicht von LEGROUX u. MAGROU (1920) über Vibrio cholerae, KAHN u. NONIDEZ (1936) über Mycobacterium-Species, GREENE (1938) über Clostridien und Bacillus acetoaethylicum, STÖSS (1955) über zahlreiche Species unterschiedlicher Verwandtschaftsgruppen, FETTING (1957) über die penicillininduzierte L-Phase von Proteus vulgaris, HENNEBERG (1957) über verschiedene Species und Bakterien unter Hemmstoff-, Selenit- und Phageneinwirkung sowie LEWICKI (1958) über Mycobacterium tuberculosis.

Von den Veröffentlichungen, die sich mit mikroskopischen Untersuchungen an lebenden Mikro- und Makrokolonien befassen, sind besonders zu erwähnen diejenigen von PRINGSHEIM (1918) sowie PRINGSHEIM u. LANGER (1924) über Bacillus mycoides, SCHUBERT (1920), KORINEK (1934/35), BISSET (1938) über R- und S-Formen, BARTMANN u. HÖPKEN (1963) über die penicillininduzierte L-Phase von Proteus vulgaris und Alkaligenes faecalis sowie die PPLO-Gruppe und GILLERT (1963) über Bacillus circulans. Dabei ist zu erkennen, daß bestimmte Gattung oder Verwandtschaftsgruppen wie Bacillus, Mycobacterium, Pseudomonas und Enterobacteriaceen besonders häufig als Untersuchungsobjekte genannt sind, wobei es sich aber nicht nur um menschen- oder tierpathogene Formen

handelt. Die Befunde sind im einzelnen erwartungsgemäß unterschiedlich und vielseitig.

Für das Erkennen von Struktureigentümlichkeiten scheinen jüngere Kolonien besonders geeignet zu sein, da mit zunehmendem Alter ein Undeutlichwerden eintritt.

Selten kommen Kolonien vor wie die von Staphylococcus oder Sarcina, die wegen ihrer rundlichen Bauelemente scheinbar aus einer einheitlichen Anordnung von Zellen bestehen (STÖSS 1955, HENNEBERG 1957). Bei stäbchenförmigen Bakterien und damit der überwiegenden Anzahl von Species ist der Koloniebaufbau differenzierter. Vor allem bei Bacillus finden sich wellenförmige Strukturen von Zellsträngen (STÖSS 1955), die besonders auch bei bestimmten Stämmen von Mycobacterium tuberculosis ausgeprägt sind und sich im Koloniezentrum derart auftürmen können, daß ein Abheben von Kolonieteilen vom Substrat erfolgt (LEWICKI 1958). An solchen Bildern werden die Dynamik und die Kräfte bei der Koloniebentwicklung deutlich. Ältere Stadien sind in sich meist dichter gelagert als jüngere und weisen vielfach Schichtungen auf. Diese können auch bei Kokken als Zweischichtung auftreten (STÖSS 1955) und sind besonders bei Bacillus und Enterobacteriaceen ausgeprägt (HUTCHINSON 1907; STÖSS 1955; HENNEBERG 1957). Bei letzteren kommen vor allem Dreischichtungen vor, wobei die basale und die obere Schicht eine mehr horizontale Anordnung der Zellen erkennen lassen, während die Mittelschicht aus mehr oder weniger senkrecht gestellten Zellsträngen besteht, die oben gewölbeartig gekrümmt verlaufen (STÖSS 1955). Die Schichten folgen einem bewegten Oberflächenprofil parallel wie bei LEGROUX u. MAGROU (1920) für bizarr gefaltete Kolonien von Vibrio cholerae oder bei STUNKAT (1961) für Salmonellen, deren Kolonien eine zentrale Erhebung aufweisen.

Unterschiedlich anfärbbare Kolonieteile können schichtenartig voneinander abgesetzt ("Farbschichtungen") (LEWICKI 1958) wie bei Mycobacterium tuberculosis oder unregelmäßig angeordnet sein als Ausdruck von be-

ginnendem Zerfall bestimmter Zellen oder dem Vorliegen von Mischkulturen (STÖSS 1955; HENNEBERG 1957).

Von besonderer Bedeutung für den Stoffaustausch zwischen Kolonie und Nährboden ist die Art der Verbindung zwischen beiden (HENNEBERG u. WOLFF 1963). Sie kann eng sein, was besonders durch "Verwurzelung" oder Tiefenwachstum bedingt ist, oder aber lockerer bzw. für Koloniteile ganz fehlen.

Derartige Differenzierungen gelten vor allem für den zentralen Koloniteil, während zum Rand hin die Koloniehöhe abnimmt, ein vorhandener Schichtenaufbau schwindet und die Zellen als flach wellige Stränge meist eine gewisse horizontale Ausrichtung erkennen lassen.

Die Sporenbildung bei Bacillus und Clostridium ist meist auf bestimmte Schichten beschränkt, die entweder bevorzugt basal oder im oberen Teil der Kolonie liegen (HUTCHINSON 1907; GREENE 1938; STÖSS 1955).

Alterung und Zerfall der Kolonien stellen sich oft schon frühzeitig ein und äußern sich zuerst meist durch das Auftreten sog. "Involutionsformen", die gehäuft im Koloniezentrum vorkommen (HUTCHINSON 1907). Sie werden als Reaktion auf die Anhäufung schädigender Stoffwechselprodukte erklärt. Das Koloniewachstum erfolgt vom Zentrum aus vor allem nach außen ("zentrifugal" nach HUTCHINSON 1907) und in älteren Kolonien nur noch peripher (HENRICI 1934), so daß das Koloniezentrum aus den ältesten Zellen besteht. Gehäufter Zerfall kann auch in Form durchgehender Schichten erfolgen (STÖSS 1955). Nachdem die Mehrzahl der Zellen älterer Kolonien zerfallen ist, erfolgt bisweilen erneutes Wachstum zu sog. "Sekundärkolonien" unterschiedlicher Größe, die auch im Schnitt z. B. als "Herdbildungen" zu erkennen sind (STÖSS 1955). Die Deutung dieser Erscheinungen ist unterschiedlich, und sie können nach PREISZ (1904) aus Sporen bzw. besonders lebenskräftigen Zellen ihren Ausgang nehmen. MASSINI (1907) bildet erstmalig eine größere Sekundärkolonie von

Escherichia coli im Schnitt ab.

2.3 Entwicklung und Entwicklungsmechanismen von Bakterienkolonien

Die Frage nach dem Zustandekommen bestimmter charakteristischer Kolonieformen und -strukturen ist vielfach gestellt worden, aber weitgehend unbeantwortet geblieben (GOTSCHLICH 1929; SCHUBERT 1920). Von Bedeutung für diese sollen sein die Form der Zellen und Teilungsverbände, die spezifische Teilungsenergie, die Bildung von Interzellularsubstanz und der Widerstand der Nährbodenoberfläche.

Das Wachstum jüngster Koloniestadien läßt sich mikroskopisch gut verfolgen, während deren Einbettung nur schwer oder garnicht gelingt (LEWICKI 1958). So stellt nach SCHUBERT (1920) der Übergang vom linearen Wachstum der ersten Zellketten bei Bacillen und Salmonellen durch Auseinanderbrechen zum Flächenwachstum den ersten Schritt zur Koloniebildung dar. Es bildet sich eine erste abgerundete Zellschicht, die durch zentripetalen Druck (HUTCHINSON 1907) Zellen nach oben drückt, so daß sich allmählich Schicht auf Schicht türmt. HUTCHINSON (1907) betont das Wirksamwerden zentrifugaler wie zentripetaler Kräfte. Durch die zunehmende Dicke wachsender junger Kolonien lassen sich Einzelheiten der weiteren Differenzierung nicht erkennen.

An Mikrokolonien beschrieben BISSET (1938), ROELCKE u. INTLEKOFER (1938) u.a. auch deutliche Unterschiede zwischen den Kolonien rauher und glatter Kolonietypen. Erstere bilden lange Zellketten mit festem Zusammenhalt, während diese bei den glatten Typen in kurze Bruchstücke oder Einzelzellen auseinanderfallen.

2.4 Einflüsse innerer und äußerer Faktoren auf die Koloniemorphologie und Feinstruktur

Während einerseits zahlreiche Autoren wie FISCHER (1897), GOTSCHLICH

(1929), HENRICI (1934) u.a. die Koloniemorphologie und den inneren Aufbau der Kolonien als mehr oder weniger spezifisch und brauchbar für Diagnostik und Taxonomie ansehen, überraschte andererseits die starke Variabilität vieler Koloniemerkmale. Die Fortschritte der Bakteriengenetik haben den Beweis erbracht, daß auch für Bakterien genetisch bedingte oder erbliche Variabilität vorkommt vor allem in Form spontan auftretender Mutationen und daneben zahlreiche äußere Faktoren modifikativ eine nicht-erbliche Variabilität bewirken (KAPLAN 1953/54; HARM 1955; WILSON u. MILES 1964). Damit werden auch Erscheinungen wie der sog. "zwangsläufige Mischinfekt" (BIERKOWSKI u. HACKENTHAL 1953/54; HACKENTHAL u. BIERKOWSKI 1957) erklärt. Bakterienkulturen und Bakterienkolonien stellen durch das spontane Auftreten von Mutanten in Verbindung mit vielfältigen Selektionsvorgängen genetisch heterogene Populationen dar (HARM 1955; HENNEBERG 1957; STOLP 1958). Modifikativ wirken auf die Kolonien z.B. die Zusammensetzung des Substrates (Feuchtigkeit, Verfestigungsmittel, Nährstoffe, Hemmstoffe) und die Temperatur. Diese Feststellungen bedeuten keinen Gegensatz zu einer vermuteten Spezifität von makroskopischen und mikroskopischen Koloniemerkmalen, sondern fordern nur eine stärkere Berücksichtigung der Variationsbreite dieser Merkmale. Als Beispiel kann Bacillus mycoides genannt werden, dessen rauher Kolonietyp als absolutes Artmerkmal galt, bis festgestellt wurde, daß diese Species auch in Direktisolierung aus Böden bereits als Glatt-Form mit völlig abweichendem Aussehen vorkommen kann (STAPP u. ZYCHA 1931).

2. 5 Die Bakterienkolonie als biologische Einheit

Obwohl FISCHER (1897) die Gestalt echter Koloniebildungen für nicht mehr zufällig ansieht, sondern als konstant und bestimmten Regeln des Wachstums und der Vermehrung entsprechend, hält er die einzelnen Individuen für selbständig und unabhängig voneinander und verneint damit das Vorliegen einer Arbeitsteilung. Andere Autoren dieser Zeit erklärten die Bakterienkolonie als "vielzelligen Organismus" oder "Zellenstaat"

(SAUL 1901; MÜNDEN 1898; SERKOWSKI 1901).

Die Entstehung spezifischer Strukturen von unterschiedlicher Differenzierung und die Beobachtungen an Bakterienkolonien, die als Ganzes in geordnetem Zustand sich auf Nährbodenoberfläche bewegen, lassen die Vermutung zu, daß Bakterienkolonien "Zellgemeinschaften eigener Art" (KORINEK 1934/35) sind und "organisierte Gebilde" (HENNEBERG 1955; 1957) darstellen.

3. FRAGESTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist es,

1. die vorhandene Literatur über Bakterienkolonien kritisch zu sichten und
2. durch eigene Untersuchungen vor allem an Hand von Kolonieschnitten die Entwicklung von Bakterienkolonien und deren Feinstruktur darzustellen, um Einblicke in die Mechanismen zu gewinnen, die diesen zugrunde liegen.

Als Modellkeime dienen Species der Gattung Bacillus. Bei diesen Stäbchenbakterien handelt es sich um zumeist lange und dicke Zellen, die färberisch gut darstellbar sind, bei der Teilung zu Ketten unterschiedlicher Länge verbunden bleiben und verschiedengestaltete charakteristische Kolonien aufbauen. Als Dauerformen bilden sie von den vegetativen Zellen gut unterscheidbare Endosporen aus, die in der versporenden Kolonie ein Moment der zusätzlichen Differenzierung darstellen. In Vorversuchen erwiesen sich diese Bakterien, in Übereinstimmung mit STÖSS (1955), als besonders geeignet für Untersuchungen über die Feinstruktur ihrer Kolonien im Schnitt senkrecht zur Nährbodenoberfläche ("Vertikalschnitte").

Die Darstellung der Feinstruktur in jeweils mehreren Altersstufen auf Standard-, Mangel- und Hemmnährböden steht im Vordergrund dieser Arbeit. Die jüngsten Stadien der Kolonieentwicklung können aus technischen Gründen nicht im Schnitt, sondern nur an lebenden Kolonien in Aufsicht studiert werden und ermöglichen somit zusätzlich einen Vergleich zwischen bestimmten Befunden an lebenden wie fixierten Zellen.

Weiterhin sollen dem normalen Typ einige Varianten gegenübergestellt werden, die einen Beitrag zu der Variation der Bakterienkolonie ermöglichen.

Besonderes Augenmerk in physiologischer Sicht gilt der Versporung und dem Sekundärwachstum. In diesem Zusammenhang stehen auch Fragen nach dem Nährstofftransport innerhalb der Kolonie und den Faktoren, die eine Verminderung des Koloniewachstums und letztlich Alterung und Zerfall bedingen.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Untersuchte Bakterienspecies:

1. Bacillus subtilis
2. Bacillus pumilus (syn. mesentericus)
3. Bacillus cereus
4. Bacillus mycoides
5. Bacillus polymyxa (syn. asterosporus)

Die Kulturen 1, 2 und 3 wurden von der Stammsammlung des Robert Koch-Institutes sowie 4 und 5 vom Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Von den Kulturen 1, 2, 3 und 4 haben wir Einsporkulturen mit dem LEITZ-Mikromanipulator (nach der bei STAPP u. ZYCHA (1931) ausführlich beschriebenen Methodik) bzw. mit dem Multipunktator-Verfahren nach E.W. SCHMIDT (ausführlich beschrieben von ÜCKERT (1959)) gewonnen, die als Ausgangskulturen für die dargelegten Untersuchungen dienten.

4.2 Methoden

4.2.1 Kultursubstrate

Verwendung fanden folgende Kultursubstrate mit 2% Agargehalt in Plastik-Petrischalen:

a) Bouillon-Pepton-Agar (Standard I-Nähragar, E. MERCK AG) als Standard-Nährboden (abgekürzt BPA),
b) Weizengrießagar nach HEIDER (1892) (mit Hartweizengrieß "AURORA") als versporungsfördernder Mangel-Nährboden (abgekürzt WgA) und
c) Bouillon-Pepton-Agar wie unter a) mit Zusatz wechselnder Konzentrationen von Chloramphenicol (Paraxin, C.F. BOEHRINGER u. Söhne GmbH) oder Penicillin (Penicillin G, Farbwerke HOECHST AG).

4.2.2 Beimpfung der Kultursubstrate

Diese erfolgte durch

a) fraktionierte Aussaat mit der Platinöse,
b) beliebige Impfpunkte mit der Platinnadel,
c) gleichmäßiges Verteilen von 3 ml einer flüssigen Kultur pro Petrischale oder
d) Aufsetzen von 43 Impfpunkten in gleichem Abstand voneinander pro Petrischale mit dem Multipunktator.

Als Ausgangsmaterial für die Beimpfung dienten entweder flüssige Bakterienkultur (10 ml Nähr-Bouillon mit 1 Öse Bakterienkultur beimpft, 24 Stunden unter mehrfachem Schütteln bei + 37° C bebrütet und mit Nähr-Bouillon auf 10^{-5} bis 10^{-6} verdünnt) oder Sporenaufschwemmung (stark versporte Bakterienkultur mit NaCl-Lösung verrieben und zur Abtötung der vegetativen Formen 5 Minuten lang auf + 80° C erhitzt).

4.2.3 Kulturbedingungen

Das Wachstum der Kolonien auf den beimpften Petrischalen erfolgte entweder bei etwa + 22° C (Zimmertemperatur) oder im Brutschrank bei + 37° C. Die bewachsenen Petrischalen wurden bei Zimmertemperatur in feuchten Kammern aufbewahrt, um ein Austrocknen des Substrates zu verhindern.

4.2.4 Auswahl der Kolonien, Zeitpunkt der Entnahme, allgemeine Versuchsanordnung

Die Makrokolonien auf Standard- und Mangelnährböden für die Anfertigung von Schnittpräparaten wurden zumeist im Alter von 1 bis 2, 10 und 30 Tagen entnommen nach Beimpfung der Petrischalen mit der Platinöse oder -nadel. Verschiedentlich kamen auch andere oder zusätzliche Entnahmen zur Auswahl. Die Schnittbefunde der verschiedenen Altersstufen

stammen jeweils von Kolonien derselben sog. Entnahmeserie, da ein und dieselbe Kolonie, zumindest in ihrer Gesamtheit, nur für die Darstellung einer Altersstufe verwendet werden kann.

Für jede Entnahmeserie wurden vom gleichen Ausgangs-Material (Bouillonkultur oder Sporenaufschwemmung) mehrere Petrischalen beimpft, die dann zur Verfügung standen, wenn diejenige der ersten Entnahme bei den folgenden verunreinigt war oder nicht mehr die geeigneten Kolonietypen enthielt. Zur Auswahl kamen dabei im Verlauf einer Serie jeweils solche, die nach zahlreichen Subkulturen in der Quantität ihres Auftretens dominierten und von der Erfahrung her als Norm angesehen wurden. Eine subjektive Selektion in dieser Richtung ist bei der Überimpfung nicht auszuschließen.

Für die Makrokolonien auf Hemmnährböden konnte die vorgenannte Methode keine Anwendung finden. Um einmal die zufällige Anordnung der Kolonien zueinander bei der Strich- und Gußbeimpfung auszuschließen, die das Ausfallen einzelner durch totale Hemmung nicht erkennen ließe, und zum anderen eine gegenseitige ungleiche Hemmung benachbarter Kolonien zu eliminieren, die einen Einfluß des Antibiotikums auf Koloniegröße und -form vortäuschen könnte, wurden die Petrischalen mit dem Multipunktator nach E.W. SCHMIDT beimpft. Dieser garantiert 43 Impfpunkte von etwa 1,5 mm Durchmesser in gleichem Abstand zueinander.

Da erfahrungsgemäß von aufgeimpften Sporen nur ein mehr oder weniger großer Anteil auskeimt und sich zu Kolonien weiterentwickelt, darf bei dieser Methode nicht von zu wenig Sporen in der Aufschwemmung ausgegangen werden, um aus dem genannten Grunde keinen etwaigen Ausfall einzelner Impfpunkte zu erhalten. Zusätzlich ist anzunehmen, daß unter dem Einfluß der Hemmstoffe ebenfalls ein Teil der an sich keimfähigen Sporen nicht auskeimt bzw. sich nach Erreichung des vegetativen Zustandes nicht weiterentwickelt. So wurde ein Verdünnungsgrad der Sporenaufschwemmung gewählt, für den sich als Pauschalwert in zahlreichen Aus-

zählungen pro Impfpunkt des Multipunktators im Mittel 300 Sporen ergaben. Im Kontrollversuch wuchsen auf Standardnährböden bei dieser Verdünnung jeweils für den betreffenden Keim makroskopisch typische Kolonien in der Anzahl der mit dem Multipunktator gesetzten Impfpunkte.

Die Empfindlichkeit der Keime gegenüber verschiedenen Antibiotika wurde im Vorversuch getestet. Mit dem breitesten Spektrum empfahlen sich Chloramphenicol und Penicillin, und zwar in Konzentrationen, die eben noch ein Wachstum ermöglichen, dieses aber deutlich hemmen oder beeinflussen, wobei Bacillus subtilis und mycoides für je eine Substanz, Bacillus pumilus und cereus für beide empfindlich waren, während Bacillus polymyxa gegenüber beiden Resistenz zeigte.

Bereits das makroskopische Bild der unter Antibiotikumeinfluß gewachsenen Kolonien läßt vermuten, daß diese nicht in dem Maße gleichartig und gleichwertig sind, wie es von solchen auf z. B. den beiden anderen Nährböden, wenn sie sich makroskopisch gleichen, für die Praxis angenommen wird. Deshalb wurde auf Entnahmeserien verzichtet und jeweils nur ein Stadium dargestellt.

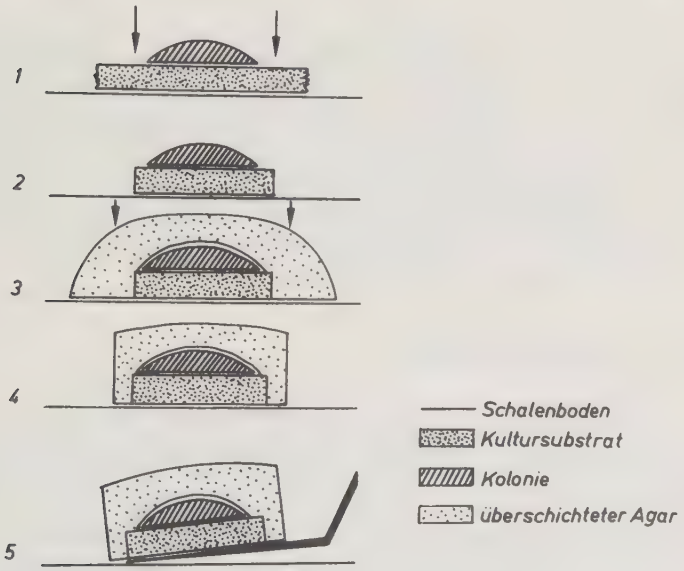
4.2.5 Schnitt-Technik

4.2.5.1 Entnahme

Bei allen kleinen und durchsichtigen Kolonien, vor allem aber auch solchen auf Weizengrießagar, erwies es sich als praktisch, die Kolonien vor der Entnahme mit einem Tuschering zu markieren und den Durchmesser durch zwei seitliche Tuschestriche zu kennzeichnen, wie es von STÖSS (1955) vorgeschlagen wurde.

Je nach Bakterienart, Nährboden, Verwachsung der Kolonien mit dem Nährboden und insbesondere Alter ist deren innerer Zusammenhalt sehr unterschiedlich und dementsprechend auch das Vermögen, die bei der Entnahme, Fixation und Einbettung unumgänglich wirksam werdenden

Eingriffe möglichst ohne größere Artefakte zu überstehen. Deshalb erwies es sich als unbedingt notwendig, die Kolonien auch von der Oberfläche her mit einer Schutzschicht zu versehen. Die von BINGEL (1947) und STÖSS (1955) bereits erfolgreich angewendete Überschichtung der Kolonien vor der Entnahme mit flüssigem Agar erwies sich in der Praxis in modifizierter Form als Methode der Wahl (siehe Schema).



Schema der Überschichtung und Entnahme im Schnitt

Hierzu wird zuerst die ausgewählte Kolonie nebst darunter befindlichem Agarblock mit einem dünnen Skalpell in senkrechter Haltung, so nahe als möglich ihrem Umriß folgend und ohne dabei den äußersten Rand zu verletzen, umrissen und so von dem übrigen Nährboden der Schale getrennt (1.). Ein zweiter Schnitt in größerem Abstand vom dem bereits geführten trennt ein zusammenhängendes Agarband ab, das nun leicht mit

Spatel und Pinzette entnommen werden kann, so daß das Agarblöckchen mit der Kolonie frei stehen bleibt (2). Erst jetzt wird der freie Raum um dieses erneut mit flüssigem Agar von etwa + 50° C gefüllt und danach die Kolonie von ihrem Zentrum her aus der geringstmöglichen Höhe unter größter Vorsicht überschichtet bzw. übergossen (3). Es erwies sich dabei als vorteilhaft, die Kolonien etwa so hoch mit Agar zu überschichten, wie der Nährboden unter ihnen dick ist, da sonst bei der Fixation und Entwässerung ein ungleiches Schrumpfen und Verkrümmen des Blöckchens eintritt.

Sofort nach Erstarren des Agars wird das ursprüngliche Agarblöckchen mit der Kolonie, die nunmehr von oben und den Seiten mit einer Schutzschicht umgeben ist, in etwa 2 mm Abstand mit dem Skalpell umschnitten (4). Nach Entfernen des anschließenden Nährbodens der Schale läßt sich mit einem untergeschobenen breiten und flachen Spatel das viel kompaktere Agarblöckchen mit der eingeschlossenen und gut geschützten Kolonie zur weiteren Behandlung herausheben (5).

4.2.5.2 Fixation und Einbettung

In Vorversuchen wurden Fixationsmittel wie Formalin (4%), Susa, Susa ohne Trichloressigsäure und iso-Propanol (50%) getestet in Verbindung mit der Einbettung in Cremolan, Paraffin-Wachs-Gemische oder evakuierte Paraffin-Wachs-Gemische nach STÖSS (1955). Im Gegensatz zu den Erfahrungen von STÖSS waren mit der Einbettung in Cremolan keine dünnen und gut gestreckten Schnitte zu erzielen, während die beiden anderen Einbettungsmittel bei allen genannten Fixationsmethoden (Dauer 15 Stunden) befriedigende Ergebnisse lieferten, ohne daß eine deutliche Überlegenheit eines Fixations- bzw. Einbettungsmittels erkennbar gewesen wäre.

Schließlich wurde der Fixation mit 50%igem iso-Propanol bei weiterer Entwässerung mit iso-Propanol bis 99% der Vorzug gegeben, da nach

dessen zweimaligem Wechsel sofort ohne andere Zwischenmedien in das Einbettungsmittel PARAPLAST (Paraffin-Kunststoff-Gemisch der BRUNSWICK Laboratories mit einem Schmelzpunkt von + 56° C) überführt werden kann.

4.2.5.3 Schneiden

Das Schneiden der in PARAPLAST eingebetteten Kolonien erfolgte senkrecht zur Nährbodenoberfläche durch das Koloniezentrum (sog. "Sagittalschnitte" nach STÖSS) mit Schlittenmikrotomen der Firmen LAUTENSCHLÄGER bzw. REICHERT. Hierzu wurden PARAPLAST-Blöckchen und Miktotommesser im Tiefkühlfach gekühlt. Schnitte von etwa 2 µ gelangen jeweils nur für kurze Zeit nach Aufenthalt der gekühlten Blöckchen und Mikrotommesser bei Zimmertemperatur. Die Schnitte wurden in der üblichen Weise auf mit Eiweißglyzerin bestrichenen Objektträgern auf Wasser gebracht, mit Hilfe einer Heizplatte bei + 40° C gestreckt und anschließend getrocknet.

4.2.5.4 Färben

Zum Färben der Schnitte wurde das Einbettungsmittel mit Xylol entfernt. Hauptsächliche Anwendung fand die Sporenfärbung nach KLEIN in modifizierter Form mit Viktoriablau an Stelle von Methylenblau. Für Zweitpräparate neben der Sporenfärbung sowie auch für junge, sicher unversporte Koloniestadien bewährte sich die einfache Färbung mit Viktoriablau, die gute und differenzierte Bilder ergibt.

4.2.5.5 Fotografieren

Für makroskopische Kolonieaufnahmen diente die LEICA mit einem 135 mm-Objektiv, Spiegelreflexzusatz und Balgengerät bei Verwendung von AGFA L AGEPE FF - Film bei Tageslicht. Die Kolonieschnitte und Mikrokolonien wurden mit der LEITZ Mikroskopkamera ORTHOMAT auf ADOX KB 17 - Film aufgenommen.

5. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

5. 1 Allgemeines

Die Darstellung der Oberflächenkolonie-Feinstruktur von Bacillus subtilis, pumilus, cereus, mycoides und polymyxa steht im Mittelpunkt dieser Untersuchungen. Hauptsächlich erfolgte diese an Hand von Vertikalschnitten durch die Koloniemitte (sog. "Sagittalschnitte").

Wegen der geringen Größe der jüngsten Koloniestadien (Alter weniger als 24 Stunden nach der Beimpfung) sowie deren Feinheit und fast immer fehlenden stärkeren Verwachsung mit dem Substrat als festigendes Element, erwiesen sich für diese die üblichen Methoden zur Anfertigung von Schnitten als wenig brauchbar. Deshalb wurde die direkte mikroskopische Beobachtung der lebenden Kolonie auf dem Substrat herangezogen. Die auf diese Weise untersuchten jüngsten Koloniestadien werden, im Gegensatz zu den älteren, an Hand von Schnitten untersuchten Makrokolonien, als Mikrokolonien bezeichnet.

Mit Ausnahme von Bacillus polymyxa wird im folgenden die Feinstruktur der genannten Species auf drei unterschiedlichen Substraten in zumeist mehreren Altersstufen beschrieben, wobei als Standardnährboden Bouillon-Pepton-Agar, als versporungsfördernder Mangelnährboden Weizengrießagar und als Hemmnährboden der erstere mit Zusätzen wechselnder Konzentrationen von Chloramphenicol oder Penicillin Verwendung fand.

Wegen des unterschiedlichen Ansprechens der Keime auf die Antibiotika ist ein Vergleich dieser Befunde auf Hemmnährböden mit denen auf Standard- und Mangelnährböden nur unvollständig möglich. Trotzdem sollen erstere bei aller Lückenhaftigkeit zur Ergänzung mitgeteilt werden und zugleich einen Ausblick geben auf Fragestellungen, die gesonderten Untersuchungen vorbehalten sein müssen.

In der folgenden Übersicht werden die wichtigsten Gesichtspunkte schematisch aufgezählt, die für eine Beschreibung und Deutung der Schnittbild-Befunde maßgebend sind.

1. Umriß des Schnittbildes:
   a) Vergleich mit dem makroskopischen Bild der Kolonie,
   b) Flächenausdehnung, Höhe und Breite der Kolonie in Abhängigkeit von der Form der Einzelzelle, Kettenbildung und Nährmedium,
   c) Verlauf und Bauelemente des äußersten, zentrifugal gerichteten Zuwachsrandes,
   d) Basalschicht und deren Verhältnis zum Substrat, Tiefenwachstum ("Verwurzelung").

2. Anfärbbarkeit des Schnittes:
   a) Einzelzellen,
   b) Kolonieteile.

3. Bauelemente der Kolonie:
   a) Morphologie der Einzelzellen,
   b) Anordnung und Ausrichtung der Einzelzellen, Ketten- und Strangbildung,
   c) Dichte der Lagerung.

4. Zonen und Schichten im Kolonieaufbau:
   a) Koloniezentrum,
   b) "Kolonieкörper",
   c) Zuwachs- und Randzone,
   d) Basalschicht,
   e) Mittelschicht,
   f) Deckschicht.

5. Versporung der Zellen:
   a) Zeitpunkt des Versporungsbeginnes,
   b) Spore und Zelle,
   c) Lage von versporten Zellen und Sporen innerhalb der Kolonie, Sporenschichten.

6. Sekundärkoloniebildung:
   a) Zeitpunkt des makroskopisch und mikroskopisch erkennbaren Auftretens,
   b) Lokalisierung innerhalb der Kolonie, Verhältnis zu den versporten Teilen,
   c) Struktur und Bauelemente der Sekundärkolonien.

7. Abnehmendes Wachstum und zunehmende Alterung der Kolonie:
   a) Norm der Zellgestalt, abweichende atypische Formen,
   b) Änderung der Anfärbbarkeit,
   c) Undeutlichwerden der Zellkonturen,
   d) zunehmender Zerfall der Zellen, "Detritus", "Kolonieleiche",
   e) abgegrenzte Stellen gehäuften Zerfalles, z.B. in Schichten als "komprimierte Zerfallschichten"

5.2 Bacillus subtilis

5.2.1 Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar:

5.2.1.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Die Größe der einzelnen Kolonien und ihr Entwicklungsstadium stehen in keinem direkten Zusammenhang zur Zeit seit der Beimpfung. Neben zahlreichen nicht ausgekeimten Sporen fanden sich Mikrokolonien in den verschiedensten Größen bis zum eben Sichtbarwerden für das unbewaffnete Auge. Es sei vorausgeschicht, daß diese Erscheinung auch bei den übrigen untersuchten Arten festzustellen war.

Die gut voneinander abgegrenzt erkennbaren Einzelzellen als Bauelemente dieser Mikrokolonien maßen im Mittel 5,0 - 1,3 µ. (Außer dem Koloniedurchmesser bei den makroskopischen Beschreibungen wurden alle übrigen Maßangaben wie Zellengröße, Koloniedurchmesser und -höhe jeweils aus den Maßen von Fotografien mit Hilfe des Vergrößerungsfaktors auf die Gegebenheiten der unvergrößerten Originalkolonien umgerechnet.)

Durch fortgesetzte Querteilung entstanden Zellketten von nur geringer Starrheit und mäßigem Zusammenhalt, die in diesem Stadium sehr leicht zu Stücken aus etwa 6 Bauelementen auseinander brachen. Diese Zellketten von begrenzter Länge bildeten zusammen mit Einzelzellen zuerst einschichtige Zellagen von annähernd runder bis ovaler Form, deren äußere Begrenzung aber auch breit lappenartig ausgebuchtet sein konnte. Die Bauelemente lagen dicht ineinander verschachtelt, so daß ein annähernd mosaikartiges Muster entstand aus Gruppen jeweils parallel gelagerter Zellen und Zellketten. Da diese in verschiedenen Winkeln aneinanderstoßen, bleiben zwischen ihnen trotz dichter Lagerung zahlreiche etwa dreieckige Lücken bestehen, die an Interzellularräume pflanzlicher Gewébe erinnern.

In diesem Alter dürften theoretisch noch alle, praktisch aber die meisten, Zellen in Teilung begriffen sein. Damit erreichen die Mikrokolonien ein Stadium, in dem vom Zentrum her Zellen nach oben gedrückt werden und eine neue Schicht auf der bisher einzigen bilden, die damit zur basalen Schicht wird. Der zweiten Schicht folgen weitere, und das Koloniewachstum findet damit auch in der 3. Dimension des Raumes statt. Mit zunehmendem Wachstum der Mikrokolonien in die Breite und Höhe sind nur noch in den Randbezirken die parallelgelagerten Schichten zu erkennen, während die Zentren durch das fortwährende Hochdrücken von Zellen für diese Betrachtungsweise zunehmend undeutlicher und unübersichtlicher werden. Hier sind die Zellketten dann bereits zu dickeren Strängen verbunden, die in horizontaler und später auch vertikaler Ebene wellig ineinander verschlungen liegen. Dieses Anordnungsprinzig erweist sich vor allem auch für jüngere Makrokoloniestadien dieser und anderer Arten der Gattung Bacillus als charakteristisch. Mit diesem Stadium ist die Grenze der Anwendbarkeit einer Direktbetrachtung lebender und wachsender Mikrokolonien für allgemeine Aussagen über deren Entstehung erreicht, und die weiteren Untersuchungen müssen an Makrokolonien mit Hilfe von Schnittpräparaten erfolgen.

5.2.1.2 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 1 Tag bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche, flache Kolonie von etwa 2,0 mm Durchmesser, grießartig opake Oberfläche, relativ scharf begrenzt.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Einheitlich aufgebaute Kolonie mit zunehmendem Profilabfall nach dem Rande. Undeutliche Schichtung. Durchmesser etwa 1,7 mm und maximale Höhe 0,07mm.

Als Grundelement finden sich kurze dicke Zellen (im Viktoriablau-Präparat durchschnittlich 2,8 x 1,5 µ groß, im Präparat gefärbt nach KLEIN etwas schlanker), die im Längsschnitt zu mehreren in Ketten, und diese wiederum im Längs- und Querschnitt zu oft dicken Strängen verbunden, erkennbar sind). Der wellenförmige Verlauf der dicken Stränge ist besonders deutlich in den randwärts gelegenen Kolonieteilen festzustellen, wo auch Strangquerschnitte von einem Durchmesser bis zur halben Koloniehöhe getroffen sind. Es findet sich hier also dasselbe Bauprinzip wieder, wie es schon in der älteren Mikrokolonie, vom Zentrum her die parallele Schichtung durchbrechend, anzutreffen ist.

Im Koloniezentrum beginnt bereits eine undeutliche Schichtung, wie sie für die älteren Stadien charakteristisch ist. Auf einer Basalschicht ohne besondere Struktur erhebt sich die Mittelschicht aus angedeutet senkrecht zur Nährbodenoberfläche stehenden Ketten, die im Schnitt nach oben bogig enden. Darüber liegt zum Abschluß die flachere Deckschicht.

In dem unteren Teil des Koloniezentrums, dessen Zellen etwas auseinandergewichen sind, fällt an den mit Viktoriablau gefärbten Schnitten auf, daß neben dem Gros der schwach angefärbten Zellen zahlreiche solche vorkommen, deren Inneres fast ungefärbt scheint, die aber dafür mit einem größeren oder mehreren kleinen, scharfumrissenen, dunkelblau angefärbten Körnchen versehen sind. Solche Zellen können mit den erstgenannten in einer Kette vereint vorkommen. In den mehr randwärts

gelegenen Kolonieteilen kommen Zellen mit Körnchen auch regellos verstreut außerhalb der Basis vor. Schnitte derselben Kolonie, die nach KLEIN unter Erhitzen gefärbt wurden, zeigen diese Erscheinung nicht. Sie sind vielmehr einheitlich dunkel angefärbt und durchweg unscharf granuliert oder im Zentrum aufgehellt. Letzteres könnte den Beginn der Sporenbildung andeuten.

5.2.1.3 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 5 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 4 mm Durchmesser, mit erhabenerem Randwulst und flachem Zuwachsrand. Oberfläche grießartig-runzelig. Tiefenwachstum ist erkennbar.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 fach): Geringfügig ungleiche Schnitthälften, Durchmesser etwa 3,7 mm. Höchste Erhebungen randwärts gelegen (dem makroskopischen Wulst entsprechend), dazwischen gleichmäßig flacher. Maximale Erhöhungen etwa 0,2 mm, darunter knapp 0,2 mm ein Tiefenwachstumswulst.

Dieses Koloniestadium zeigt im zentralen Teil zwischen dem Randwulst, im Schnitt als zwei Erhebungen erscheinend, eine deutliche Schichtung. Die Basalschicht erstreckt sich etwa über ein Drittel der Koloniehöhe. Bauelemente sind dünne schlanke Stäbchen in mehr oder weniger dichter Lagerung ohne ein erkennbares Ordnungsprinzip. Die obere Hälfte dieser Basalschicht ist, vermutlich artefiziell, aufgelockert. Deutlich ist die Abgrenzung zur Mittelschicht, der Sporenschicht. Deren unteres Drittel wird aus atypischen Zellen von rundlich-ovaler Gestalt gebildet, die bis 3,2 x 1,6 µ groß sein können. Sie sind stark angefärbt, und vereinzelt finden sich zwischen ihnen "normale" Zellen von durchschnittlich 3,2 x 0,7 µ, die teilweise versport sind. Die länglich ovalen Sporen werden mit der Sporenfärbung nach KLEIN stark angefärbt und heben sich im Präparat deutlich von allen unversporten Elementen ab. In den oberen zwei Drittel dominieren die versporten Zellen neben einigen unversporten "normalen" und dicken atypischen Zellen. Die für das Erkennen von Details äußerst

günstige geringe Dicke dieser Schnitte läßt, neben den in diesem Stadium in der Mittelschicht nicht immer anzutreffenden atypischen Zellen, die schon bei der 1. Entnahme andeutungsweise erkennbare und beschriebene Senkrechtstellung der Zellketten und -stränge hier nur geringfügig erkennen.

Den Abschluß bildet die Deckschicht aus meist dünneren schlanken Zellen, die der Basalschicht ähnelt, aber in der Lagerung der Zellen weniger dicht ist und als Ausläufer des obersten Teiles der Mittelschicht Andeutungen einer bogigen Struktur zeigt. Vereinzelt sind Zellen versport.

Diese deutlich abgesetzte Schichtung der Kolonie beginnt sich im Bereich der höchsten Kolonieerhebungen zu verwischen. In der unteren Koloniehälfte endet hier auch die Versporung. Die zweiteilige Mittelschicht dehnt sich nach oben stark versport zugunsten der Deckschicht aus und geht basal über in dichte Lagen von Zellsträngen aus "normalen" Zellen, die starke, nach außen gerichtete Auffaltungen und Wellungen zeigen. Mit zunehmender Abnahme der Koloniehöhe fehlen auch im oberen Kolonieteil die versporten Zellen, so daß die Kolonie mit dichten Strängen welliger Anordnung aus einheitlichen vegetativen Zellen endet. Ein derartiges flaches Auslaufen der Kolonie über längere Strecken soll fürderhin als "Zuwachsrand" gegenüber dem deutlich abgesetzten erhabeneren zentralen "Koloniekörper" bezeichnet werden.

Der Koloniekörper liegt deutlich in den Nährboden eingesenkt. Zu dem Randwulst der Oberflächenkolonie, und von dieser ausgehend, verläuft etwa spiegelbildlich ein Kranz lockeren Tiefenwachstums in das Substrat. Es besteht aus einem Netzwerk dünner, gut anfärbbarer und nur vereinzelt versporter Zellen. Auffällig viele Zellketten sind davon im Längsschnitt getroffen.

5.2.1.4 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 4 mm Durchmesser, mit erhabenerem Randwulst und geringerer medianer Erhebung. Schmaler Zuwachsrand. Oberfläche grießartig. Tiefenwachstum ist erkennbar.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Geringfügig ungleiche Schnitthälften. Durchmesser etwa 3,4 mm und 0,16 mm maximale Höhe. Höchste Erhebung im Zentrum und randwärts als Wulst. Deutlicher Schichtenaufbau. Unter den äußeren Erhebungen maximal 0,24 mm Tiefenwachstum.

Im Umriß und Aufbau ähnelt diese Kolonie sehr der vorgangegangenen Entnahme nach 5 Tagen. Insgesamt ist die Versporung weiter fortgeschritten. Das Wachstum bleibt überwiegend auf den äußersten Rand beschränkt, aber eine Alterung in Form von beginnender Zellauflösung kann noch nicht festgestellt werden. Der Koloniekörper zeigt in seiner Schichtung weitgehende Übereinstimmung mit dem Stadium nach 5 Tagen, so daß nur Abweichungen und Ergänzungen angeführt werden.

Die Basalschicht besteht in ihren untersten direkt an das Substrat grenzenden Zell-Lagen aus Bauelementen, welche den doppelten Durchmesser der sonst schlanken und dünnen Zellen aufweisen. Ihr Lumen scheint leicht granuliert oder segmentiert, und einzelne Zellen im Zentrum sind versport. In der Basalschicht wie auch in den anderen Schichten kommen verschiedentlich Zellen vor, die in ihrer Gestalt nicht von der Norm abweichen, aber mit der Sporenfärbung nach Art der Sporen säurefest rote Färbung annehmen. Schnitte der gleichen Serie zeigen, mit Viktoriablau gefärbt, unter den vegetativen Zellen keine Besonderheiten. Diese abweichend anfärbbaren Zellen sollen im folgenden als "säurefeste Stäbchen" bezeichnet werden.

In der Mittelschicht ist diesmal eine Dreiteilung anzutreffen, indem zwei Schichten aus weitgehend versporten, kompakten Zellen neben freien Sporen und vereinzelten "säurefesten Stäbchen" durch eine Schicht aus überwiegend atypischen Bauelementen getrennt werden. Es handelt sich dabei um dicke, rundliche Zellen von etwa 3,5 x 2,0 µ gegenüber den "normalen" Zellen mit durchschnittlichen Maßen von 3,6 x 0,7 µ. Oft sind

sie zu zweit verbunden, wobei eine rundliche Zelle neben einer länglichen liegen kann. Auch spindelförmige oder gekrümmte Gebilde kommen vor. Sie sind durchweg stark blau angefärbt, und einzelne davon zeigen nach der Sporenfärbung einen dunkelroten Inhalt, der an eine voluminöse Spore erinnert.

Den Abschluß bildet die Deckschicht geringer Höhe aus dicht verflochtenen Zellen, die durchsetzt sind mit wenigen "säurefesten Stäbchen" und noch weniger Sporen.

Dieser Schichtenaufbau durchzieht das Koloniezentrum zwischen den beiden höchsten Erhebungen. Weiter nach außen gesehen bleiben die unversporte Basalschicht und darüber eine einheitliche Schicht aus vegetativen Zellen und Sporen mit stark gewellter Strangstruktur, die allmählich ineinander übergehen. Von diesem Bereich geht, räumlich gesehen, wieder ein Kranz von Tiefenwachstum aus, der das Substrat mit schlanken Zellen durchzieht, wie sie auch die Basalschicht der Oberflächenkolonie aufbauen. Die äußersten Teile des Tiefenwachstums sind dichter, beinahe klumpig, und zugleich stark versport.

Vom Beginn des Tiefenwachstums nach außen ist die gesamte Koloniehöhe einheitlich mit Sporen durchsetzt. Darauf folgt der flache äußerste Zuwachs aus unversporten Zellen in wellig gelagerten Ketten.

5.2.1.5 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 20 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 9,0 mm Durchmesser, flache, konzentrische Wülste im Zentrum und dünner, schmaler Zuwachsrand. Oberfläche glänzend und mit weißlichen, opaken Granulierungen, die seit einem Alter von 15 Tagen eben erkennbar sind. Deutliches Tiefenwachstum.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x) : Kolonie von etwa 8,8 mm Durchmesser und 0,2 mm maximaler Höhe. Profil mit drei Erhebungen im Zentrum, von dort allmählich nach außen abfallend. Starkes Tiefenwachstum, maximal 0,7 mm in das Substrat, und zahlreiche Stellen mit Sekundärwachstum verschiedener Ausdehnung durch die gesamte Kolonie.

Beim Vergleich mit früheren Entnahmen (nach 5 bzw. 10 Tagen) ist inzwischen eine starke Zunahme an Flächen- wie Höhenausdehnung festzustellen. Trotzdem ist für dieses Stadium das Wachstum primärer Bauelemente nur noch von untergeordneter Natur, an dessen Stelle vielmehr Sekundärwuchs und letztlich Alterung und Zerfall treten.

Im Schnittprofil besonders des Zentrums überrascht die Ähnlichkeit mit jüngeren Stadien. Obwohl die primären Zellen weitgehend bis in den Zuwachsrand hin versport sind, ist im Übersichtsbild noch die typische Dreischichtung in Basis, Mitte und Decke zu erkennen. Die meisten unversporten Zellen befinden sich dabei in der ehemaligen Deckschicht, während die rundlichen atypischen Zellen der Mittelschicht nicht mehr festzustellen und wahrscheinlich bereits zerfallen sind.

Das Gesicht dieses Koloniestadiums wird geprägt durch diffuses Sekundärwachstum aus stark anfärbbaren vegetativen Zellen inmitten einer Umgebung aus überwiegend versporten Elementen und absterbenden vegetativen unversporten Zellen. Die Zellen des Sekundärwachstums sind bisweilen von weniger zerfallenen primären Zellen nur undeutlich abzugrenzen, vor allem wenn ersteres selbst bereits einer gewissen Alterung unterliegt.

Wie bereits angedeutet, sind auch zahlreiche Stellen gehäuften Sekundärwachstums in der Kolonie vorhanden, teils makroskopisch erkennbar, die im folgenden als "Sekundärkolonien" bezeichnet werden. Ihre vertikale Verteilung in der Kolonie kann sehr verschieden sein. Im basalen Teil bilden sie oftmals Vorwölbungen in das Substrat hinein oder sind von verschiedener Größe zwischen Basis und Decke verteilt. Bisweilen trifft man auch auf Sekundärkolonien, die sich über die gesamte Höhe der Primärkolonie erstrecken. Der charakteristischste Typ, der auch makroskopisch am deutlichsten sichtbar ist, befindet sich unter der Oberfläche der Kolonie mehr oder weniger "hühneraugenartig" vorgewölbt.

Neben den kompakten Sekundärkolonien kommt Sekundärwachstum aber auch diffus verteilt bis zu kleinen Anhäufungen vor, ohne eine bevorzugte Lokalisierung erkennen zu lassen.

Das kräftige Tiefenwachstum bildet primär wieder einen Kranz unter der Oberflächenkolonie, der seinen Ursprung etwas außerhalb der maximalen wulstartigen Oberflächenerhebungen hat. Da dessen Wachstum in allen drei Dimensionen des Raumes erfolgt, füllen zentripetal wachsende Ausläufer auch den primär freien Raum unter dem Zentrum der Oberflächenkolonie. Das Tiefenwachstum zeigt in der Außenregion eine stärkere Verdichtung seiner Struktur. Es ist insgesamt stark versport, und im Zentrum wie auch außen kommt gleichmäßig verdichtetes Wachstum vor, das möglicherweise sekundären Ursprungs ist.

5.2.1.6 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwas unregelmässiger Begrenzung, median eingesunken, mit ungleich breitem Zuwachsrand. Durchmesser in Schnittrichtung etwa 9,0 mm. Oberfläche schleimig-glänzend, mit undeutlichen opaken Granulierungen in der Art von Sekundärwachstum. Starkes Tiefenwachstum.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Gealterter Aufbau, Kolonie im Zentrum stärker eingefallen, als es makroskopisch zu erkennen war. Sekundärwachstum, das besonders im Tiefenwachstur ausgeprägt ist. Letzteres reicht 0,6 mm in das Substrat.

Die Kolonie zeigt im Schnitt als Folge starker Alterung und Zerfall weder eine deutliche Strukturierung noch Andeutungen einer ehemaligen Schichtung. Es herrschen dicht liegende Sporen vor neben blauviolett anfärbbaren und diffus verteilten Zellresten. Letztere sind am deutlichsten in der ehemaligen Deckschicht zu finden.

Ähnlich dem Stadium nach 20 Tagen ist zahlreiches Sekundärwachstum anzutreffen in Form von ausgedehnten Sekundärkolonien ebenso wie in diffus verteilter Form. Es dominieren als Bauelemente die dicken, rundlich-ovalen Zellen. Im Koloniezentrum sind die meisten größeren und ältesten Sekundärkolonien bereits mehr oder weniger stark zerfallen. Vereinzelt finden sich in Sekundärkolonien wie in diffusem Sekundärwuchs Zellen, die deutliche Versporung erkennen lassen.

Die Versporung der primären vegetativen Zellen reicht weit in dem flachen Zuwachsrand nach außen. Nur die äußersten Zellen, die meist atypische Form zeigen, sind stark anfärbbar, aber nicht versport.

Das Tiefenwachstum unter dem Koloniekörper reicht inzwischen bis unter dessen Mitte und bildet eine relativ einheitliche Lage mit erheblicher Ausdehnung in die Tiefe des Substrates. Es ist sehr stark versport und durchsetzt mit größeren oder kleineren Sekundärkolonien, die teilweise eine auffällig kompakte und rundlich-knollenartige Form haben. Im Gegensatz zu dem Stadium nach 20 Tagen sind diese deutlich von den ebenfalls kompakteren Teilen unterschieden, die am Rande des Tiefenwachstums liegen und mit weitgehend atypischen Zellen noch ein geringes primäres Wachstum aufweisen.

5.2.2 Oberflächenkolonien auf Weizen grieß-Agar:

5.2.2.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Die Einzelzellen maßen im Durchschnitt 8,0 x 1,2 µ. Im Gegensatz zu den Mikrokolonien auf Bouillon-Pepton-Agar zeigten hier die Zellketten bei der Teilung eine geringere Neigung zum Auseinanderbrechen. Die

ersten Aggregationen bestehen daher aus Zellketten von durchschnittlich 10 Zellen, die recht starr ausgerichtet scheinen und deshalb anfangs meist länglich und unregelmäßig begrenzt, auf keinen Fall aber rundlich oder kreisförmig sind. Doch mit zunehmender Anzahl von Teilungsschritten zerfallen auch Zellketten in einzelne Bauelemente und füllen bestehende Zwischenräume aus, die Mikrokolonien runden sich zunehmend ab. Die Starrheit und Länge zahlreicher Teilungsprodukte ermöglicht keine regelmäßige und parallele Schichtenbildung vom Zentrum her mit fortschreitendem Wachstum. Vielmehr gleiten Zellketten und lappenartige Zusammenlagerungen übereinander, und daneben werden mehrschichtige Stellen durch Hochdrücken von Zellen gebildet. Dies bewirkt schon in jüngeren Stadien eine Unregelmäßigkeit der Oberfläche, die sich mit zunehmendem Umfang der entstehenden Stränge verstärkt und deutlich z. B. im Schnitt der 2 Tage alten Makrokolonie erkennbar ist.

Der Umriß der Mikrokolonien rundet sich mit zunehmendem Alter, während einige längliche Auswüchse mit geringer, aber deutlicher Rechtswendigkeit vom Koloniezentrum wegstreben in einer Weise, die an den für Bacillus mycoides so typischen Aufbau erinnert.

5.2.2.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche weiße Kolonie von etwa 3,5 mm Durchmesser. Grießartig, mit faserigem Rand und unregelmäßiger Begrenzung.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Erhabene Kolonie mit welligem Oberflächenprofil, etwa 3,3 mm Durchmesser und maximal 0,04 mm hoch. Vom Zentrum her allmählicher Abfall, in dünnen Zuwachsrand auslaufend.

Der Feinaufbau dieser Kolonie auf einem Mangelnährboden zeigt sehr bewegte Wellenzüge von dicken Strängen, die durch geringe Vorwölbungen

die Oberfläche der Kolonie uneben gestalten. Die Lage der Zellen von relativ einheitlicher Größe (6,0 x 1,1 µ) ist innerhalb der Stränge sehr dicht. Dafür finden sich dort, wo diese Zellenstränge verschiedener Richtung zusammenstoßen oder auch Wirbel bilden, deutliche Hohlräume im Koloniegefüge. Besonders an den noch dickeren Randteilen wird der wellige Aufbau nicht nur in vertikaler, sondern auch horizontaler Ebene durch abwechselnde Längs- und Querschnitte deutlich und bestätigt die Struktur, die an den Mikrokolonien in der Aufsicht erkennbar wurde.

Mit der Sporenfärbung stellen sich die Zellen im Innern leicht granuliert oder im Zentrum undeutlich rötlich gefärbt dar. Die Zellen der oberen Hälfte des Koloniekörpers zeigen bereits starke Versporung. Mit Viktoriablau sind die unversporten Zellen einheitlich blau angefärbt und die Sporen als helle ovale Aussparungen in den sonst blauen Zellen zu erkennen.

5.2.2.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Flache, weißliche Kolonie von etwa 3,0 mm Durchmesser, undeutlich verlaufend, mit schleimig-glänzender Oberfläche.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125fach): Flache zusammengefallene Kolonie, die allmählich in sehr dünnen Zuwachsrand ausläuft. Durchmesser etwa 2,8 mm und maximal 0,03 mm hoch. Unter dem Koloniezentrum etwa 0,22 mm Tiefenwachstum.

Die Kolonie ist stark versport, und die Sporen liegen teils mit Resten ihrer zugehörigen Zellen so dicht, daß keinerlei Anklang an eine Struktur des Stadiums nach 2 Tagen, noch eine Schichtung festzustellen ist. Die Sporen sind auffällig verschieden stark angefärbt.

Ziemlich regellos verstreut in der Kolonie finden sich neben Sporen, vom Zentrum nach außen an Häufigkeit zunehmend, folgende Zelltypen:

a) Im Lumen leer erscheinende Zellen mit stärker angefärbter Zellmembran von etwa 2,4 x 0,8 µ.

b) Dicke, plumpe Zellen von etwa 3,6 x 1,4 µ mit stärker angefärbten Zellumen. Die Anfärbung kann nach der KLEINschen Sporenfärbung blauviolett oder rötlich sein. Bisweilen sind mehrere Zellen zu deutlichen Ketten verbunden.

c) Dünnere Zellen von etwa 3,6 x 0,8 µ Größe, die sich mit der Sporenfärbung hell rotviolett, an den Polen dunkler, darstellen lassen. Die stärkere Anfärbung der Pole kann auch fehlen oder nur an einem Pol in Form eines Körnchens erfolgen.

Ein gehäuftes Auftreten der unter b) genannten Typen scheint im basalen Teil der Kolonie sowie im äußersten Randzuwachs vorzukommen.

Das Tiefenwachstum durchzieht das Substrat locker kettenartig und besteht hauptsächlich aus versporten Zellen und Sporen neben undeutlichen Zellresten. Häufiger sind auch noch die unter a) angeführten Zellen hier festzustellen.

5.2.2.4 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Keine qualitativen Veränderungen gegenüber der Entnahme nach 10 Tagen feststellbar. Koloniedurchmesser etwa 5,0 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht 125 x): Gleichartig aufgebaute, relativ erhabene Kolonie, die nach außen langsam abfällt. Durchmesser etwa 4,4 mm und 0,04 mm hoch. Im Zentrum starkes Tiefenwachstum von etwa 0,32 mm.

Der wenig differenzierte Aufbau dieser sehr stark versporten Kolonie ähnelt sehr dem vorgenannten Stadium. Die Alterung ist entsprechend

weiter fortgeschritten. Zwischen den dichtliegenden Sporen, die mit völlig zerfallenem, blau angefärbten Zellmaterial diffus durchsetzt sind, befinden sich maschenartige kleine Lücken und blasige, kleine, kaum angefärbte Zellen, die in ihrer Gestalt undeutlich erkennbar sind. Durch den zentralen Teil der Kolonie zieht sich bis zu den sehr flachen Zuwachsrändern ein "Band" aus blauangefärbten, komprimierten Zellresten in dünner Lage auf oder geringfügig über dem Substrat.

Lediglich in den äußersten, ebenfalls stark versporten Kolonieteilen ist noch eine geringe Struktur in Form von Strängen aus undeutlich konturierten Zellen zu erkennen. Die Sporen sind auffällig verschieden stark angefärbt, am schwächsten in den Rändern der Kolonie, und differieren auch in ihrer Größe.

Das stark versporte Tiefenwachstum ist wieder locker netzartig gestaltet. Nur in den äußersten Teilen haben sich klumpige Aggregate gebildet, die neben versporten aus zerfallenden dicklichen Zellen blauer Anfärbung bestehen.

5.2.3 Oberflächenkolonien aus Multipunktatorbeimpfung von Sporenaufschwemmung auf Bouillon-Pepton-Agar + 1,0 γ Chloramphenicol/ml bei Zimmertemperatur.

Nach einem Tag zeigte sich nur bei 17 von 43 Impfpunkten des Multipunktators schwaches Wachstum in Form zahlreicher feinster, tröpfchenartiger und makroskopisch eben erkennbarer Kolonien. Im Alter von 4 Tagen nach der Beimpfung waren an allen 43 Impfpunkten inzwischen kompakt gewordene Kolonien gewachsen, die nach 15 Tagen einen Durchmesser von im Mittel 5,0 mm erreichten. Mit ihren unregelmäßigen Umrissen und dem uneinheitlichen Aufbau aus opaken neben durchscheinenden Teilen in der Art von Sektoren und Proliferationen nach außen oder oben zeigten diese Kolonien erhebliche Abweichungen von der Norm und der Kontrollbeimpfung

auf Bouillon-Pepton-Agar ohne Chloramphenicol. Bei letzterer ergaben alle Impfpunkte bereits nach 1 Tag gleichartige Kolonien von etwa 4,0 mm Durchmesser, die nach 15 Tagen im Mittel einen Durchmesser von 7,0 mm erreichten.

Makrokolonie nach 15 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 4,9 mm Durchmesser, die von kaum sichtbarem Zuwachsrand umgeben ist. Uneinheitlicher Aufbau aus opaken und glasig-durchscheinenden "hellen" Kolonieteilen, letztere erhabener.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Flache Kolonie, an 3 Stellen mit proliferationsartig erhabenerem Wachstum, das links im Schnitt eine maximale Höhe von 0,08 mm erreicht. Breiter und sehr flacher Zuwachsrand. Durchmesser 4,8 mm.

Die Kolonie zeigt bereits erhebliche Zerfallserscheinungen, wenngleich Struktureinzelheiten eben noch zu erkennen sind.

Die äußersten und damit jüngsten Teile des Zuwachsrandes bestehen aus dicklichen Zellen, die sich kräftig anfärben lassen. Zentripetal gesehen werden diese immer undeutlicher konturiert, sind miteinander verklumpt und stark mit Lagen von Schleim durchsetzt, der nach der Sporenfärbung kräftig rot erscheint.
Die im makroskopischen Bild "normalen" und opaken Kolonieteile sind im Schnitt verhältnismäßig flach und anteilmäßig dominierend. Deren Aufbau ist etwa gleichartig und zeigt eine mehr oder weniger deutliche Dreischichtung, die am stärksten in der rechten Schnitthälfte ausgeprägt ist. Am dichtesten liegen die undeutlich abgegrenzten Zellen in der Basal- und Deckschicht und färben sich stark an, ohne daß ein Ordnungsprinzip erkennbar wäre. Die Mittelschicht ist dagegen lockerer und schwächer anfärbbar, wodurch Details besser sichtbar werden. Sie zeigt die für normale Bacillus-subtilis-Kolonien charakteristische Anordnung dicker Zellstränge in Wellenlinien, die zumeist längs angeschnitten sind und im Mittelteil senkrecht bis schräg verlaufen. Diese Schicht ist, wie die darüberliegende, nur

locker und schwach versport, während die Basalschicht die meisten Sporen enthält. Zunehmend nach dem Rand hin ist in die beiden äußeren Schichten Schleim eingelagert, der am Übergang vom Koloniekörper zum Zuwachs die Oberfläche bedeckt.

Einen ähnlichen Aufbau zeigt auch die noch flachere Koloniemitte. Nur ist dort die Schichtung weniger stark ausgeprägt, und die beiden äußeren Schichten sind von sehr geringer Höhe, aber durchweg stark mit Schleim durchsetzt.

Die drei proliferationsartigen Erhebungen überragen die flachen Koloniteile erheblich und liegen deutlich in das Substrat eingesenkt. Eine Ursache für diese Art der Ausdehnung nach oben und unten dürfte neben Struktureigentümlichkeiten in der Behinderung des Flächenwachstums durch die benachbarte Koloniemasse zu suchen sein. In ihrem untereinander ähnlichen Aufbau unterscheiden sie sich deutlich von der flachen übrigen Kolonie. Gegenüber dieser sind auch kaum noch Bauelemente erhalten geblieben, die als primär angesehen werden können. Mit der Sporenfärbung nach KLEIN sind als Grundsubstanz schwach rötlich gefärbte und stark mit Schleim durchsetzte Zellreste vorhanden, die eine Wellenstruktur in vertikaler Ebene zeigen. Makroskopisch bestehen diese drei Bereiche aus durchscheinender Substanz und ähneln den bei der Glatt-Variante von Bacillus cereus beschriebenen sporenarmen "Hell-Kolonien bzw. - Sektoren". Sie zeigen ebenfalls nur schwache und unregelmäßige Versporung und sind mit Nestern von Sekundärwachstum durchsetzt, das aus dicklichen, teils gekrümmten und stark anfärbbaren Zellen von im Mittel 3,2 x 1,5 µ in dichter Lagerung besteht. Die Abgrenzung zum Substrat ist scharf, aber es reichen auch bereits zerfallene unregelmäßige Ausläufer von der Basis in den Nährboden, die schwach versport sind und ebenfalls klumpig-dichtes Sekundärwachstum zeigen.

Die Kolonien der Kontrolle haben im Schnitt einen Aufbau, der stark von den vorgenannten Befunden abweicht und der Norm von Bacillus subtilis auf Bouillon-Pepton-Agar entspricht.

5.3. Bacillus pumilus

5.3.1 Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar:

5.3.1.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht.

Die ersten Beobachtungen erfolgten 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Hinsichtlich grundsätzlicher und allgemeiner Aussagen über die Entstehung der Mikrokolonien sei auf diese bei Bacillus subtilis verwiesen.

Die lebenden Einzelzellen als Bauelemente der Mikrokolonien von Bacillus pumilus maßen im Mittel 9,0 x 1,2 µ. Es scheint, als blieben bei diesem Keim, im Gegensatz zu Bacillus subtilis, die Teilungsprodukte der Zellen oft zu längeren und auch starreren Ketten aus bis zu 10 und mehr Bauelementen verbunden. Dies bedingt vor allem bei den jungen Stadien der Mikrokolonien eine meist sehr unregelmäßige Begrenzung. Unter den längeren Ketten sind auch solche zu beobachten, die keine Unterteilung in Zellen erkennen lassen und zur Schlingenbildung neigen. Eine deutliche sukzessive Bildung parallel gelagerter Schichten vom Zentrum aus wurde bei Bacillus pumilus vermißt. Vielmehr lagern sich bereits in kleinen Zellgemeinschaften an verschiedenen Stellen Zellen, Zellketten oder "Fäden" übereinander und ergeben in den älteren Stadien überraschend, wohl durch nachträgliches Ausfüllen von Zwischenräumen, doch mehr oder weniger rundliche Kolonien mit einem im Zentrum am stärksten ausgeprägten Wachstum in die Höhe.

Die Überschaubarkeit der Strukturen älterer Mikrokolonien ist, von deren Randbereichen einmal abgesehen, durch das Fehlen deutlich parallel gelagerter Schichten geringer als bei denen von Bacillus subtilis mit gleicher Flächenausdehnung. Dementsprechend treten auch frühzeitiger als bei jenen die ineinander verschlungenen vertikal wie horizontal gelagerten welligen Stränge aus zahlreichen Zellketten in Erscheinung, die ausgeprägt auch im Schnitt der folgenden Stadien zu erkennen sind.

5.3.1.2 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 1 Tag bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche, opake und schleimig-glänzende Kolonie von scharfer Begrenzung, etwa 1,8 mm im Durchmesser.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x) : Schnitthälften weitgehend symmetrisch, von einheitlichem Aufbau. Profil geringfügig gewellt, nach den Rändern zu allmählich abfallend. Durchmesser etwa 1,5 mm, maximale Höhe 0,04 mm.

Die Kolonie ist aus langen, schlanken Zellen von durchschnittlich 5,0 x 0,5 µ aufgebaut, die in charakteristischer Weise zu Ketten und diese zu Strängen verbunden und durch ihren welligen Verlauf abwechselnd längs oder quer angeschnitten sind. Diese Struktur findet sich einheitlich über die gesamte Kolonie. Die Stränge haben dabei einen Querschnitt von etwa 2/3 der jeweiligen Koloniehöhe. Auffällig ist eine Zweischichtung der Kolonie, wobei bis auf die äußersten Enden eine locker strukturierte Basalschicht ein Drittel und die dichtere Oberschicht etwa zwei Drittel der Koloniehöhe einnehmen. In die Basalschicht reicht die vorgenannte strangartige Strukturierung nur undeutlich im oberen Teil, während der übrige aus locker gelagerten und schwach anfärbbaren Zellen ohne deutliches Ordnungsprinzip besteht.
Eine Versporung oder deren Beginn sind nicht festzustellen.

5.3.1.3 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 7,0 mm Durchmesser, Oberfläche glänzend und geringfügig grießartig, mit konzentrischen Ringwülsten.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Kompakter, einheitlicher Aufbau. Durchmesser 5,2 mm und maximale Höhe im Zentrum 0,07 mm, aber bei geringfügig gewelltem Profil weitgehend bis zu den Rändern gleichbleibend. Die konzentrischen Ringwülste der Kolonie in vivo sind nicht deutlich erkennbar. Ränder an Höhe rasch abfallend, laufen aus in einen schmalen, flachen Zuwachsrand.

Von der größeren Flächen- und Höhenausdehnung abgesehen, ähnelt der Aufbau dieses Koloniestadiums im Prinzip dem vorgenannten. Hier ist allerdings aus der ehemaligen Zwei- eine deutliche vertikale Dreischichtung entstanden, die den größten Teil der Kolonie durchzieht. Die geringste Höhe weist die Basalschicht auf, die wohl wegen ihres lockeren Aufbaues aus überwiegend schlanken Zellen mit Abmessungen von etwa 5,0 x 0,6 µ und der scharfen Abgrenzung zu der darüberliegenden kompakten und dicht in sich verflochtenen Mittelschicht artefiziell von dieser getrennt und in sich zerrissen ist.
Trotz dieser Beschädigungen vor allem im zentralen Bereich dürfte die lockere und scheinbar regellose Anordnung der Zellen und Zellketten, ähnlich den Gegebenheiten der Entnahme nach 1 Tag, dem natürlichen Aufbau entsprechen. Ab und zu finden sich auch hier dickere, klumpig zusammengelagerte Zellen, die als erste Anzeichen einer beginnenden Alterung zu deuten sind. In dieser Schicht scheint das Wachstum bereits weitgehend beendet zu sein und konzentriert auf den darüberliegenden Kolonieteil. Eine Versporung von Zellen ist in der Basalschicht nicht festzustellen, wie auch eine deutliche Verwachsung mit dem Substrat oder Tiefenwachstum fehlen.

Von der Entstehung und der Linienführung der kräftig geschwungenen und bogigen Stränge her sind die Mittelschicht und die dünnere Deckschicht nicht überall deutlich voneinander zu trennen. Aber durch das Moment der Versporung wird die Mittelschicht eindeutig als Sporenschicht charakterisiert. Sie besteht aus überwiegend langen Zellketten und -strängen, die wie bei Bacillus subtilis mehr oder weniger senkrecht verlaufen und zur Basal-, besonders aber zur Deckschicht hin, stark bogig geschwungen sind. Ausschließlich in den senkrecht verlaufenden Zellen finden sich neben zahlreicher Versporung bereits auch freie Sporen, die etwa 2,0 x 0,8 µ messen. Die überwiegenden Bauelemente dieser Schicht sind deutlich dicker als in der Basalschicht. Im Falle einer Versporung tragen sie die Spore endständig und differieren, nach KLEIN angefärbt, auffällig von Rötlichrosa bis zum typischen Blauviolett. Besonders im

Koloniezentrum finden sich zahlreiche atypische blasige bzw. spindelförmige Zellen.

Der vertikale Kolonieaufbau schließt mit der kompakten Deckschicht ab, die mit dem oberen Teil der Mittelschicht überwiegend stark verbunden ist und auch aus denselben Bauelementen besteht. Abgesehen von deren dichter Lagerung sind die Einzelzellen nicht immer deutlich voneinander abgegrenzt zu erkennen. Bei der alleinigen Anfärbung mit Viktoriablau stellt sich die Deckschicht im Bereich des Koloniezentrums nur sehr undeutlich dar, wobei es sich möglicherweise auch hier bereits um eine Älterungserscheinung handelt.

Diese Dreischichtung durchzieht die Kolonie in dem angeschnittenen Bereich von der Mitte her gesehen ungleich weit nach außen, nämlich etwa bis zu den Stellen des beginnenden artefiziellen Auseinanderweichens der Basalschicht. Dort endet auch die Versporung, und nunmehr nimmt die Deckschicht stark angefärbt in dem Maße ab, wie die Mittelschicht an Höhe zunimmt. Nach den Rändern zugesehen verwischt sich damit die Schichtung immer mehr, und an deren Stelle treten einheitliche dicke Stränge, die in vertikaler und vor allem horizontaler Ebene gewunden sind. Im Schnitt erscheinen sie dementsprechend zumeist abwechselnd in dicken Längs- und Querschnitten bis in den äußersten dünnen Zuwachsrand. Die Randzone ist stark vom Substrat gelöst und geschrumpft, so daß sie sich besonders dicht und stark angefärbt darstellt.

5.3.1.4 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 20 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Erhabene, rundliche Kolonie von etwa 7,0 mm Durchmesser, mit breitem, dünnen Zuwachsrand. Schleimigglänzend, durchscheinend, mit zahlreichen weißlichen Granula, die etwa am 16. Tage nach der Beimpfung erkennbar wurden.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Koloniedurchmesser 6,3 mm, maximale Höhe im Zentrum 0,17 mm. Schnitthälften im Umriß weitgehend symmetrisch. Profil vom Zentrum her langsam unter geringfügiger Wellung abfallend, mit breitem Zuwachsrand. Koloniekörper mit zahlreichen Sekundärkolonien.

Gegenüber dem vorhergehenden Entnahmestadium fällt eine erhebliche Höhenzunahme der Kolonie auf, die bereits makroskopisch erkennbar war. Aber inzwischen ist für den Koloniekörper sicherlich das Wachstum weitgehend zum Stillstand gekommen, da als Ergebnis von Versporung und starker Alterung kaum noch primäre vegetative Zellen vorhanden sind. Weitere Veränderungen im Kolonieaufbau werden sich also hauptsächlich in Form von Zerfall der noch vorhandenen Strukturen bzw. des Sekundärwuchses ergeben.

Viel stärker als bei Bacillus subtilis im gleichen Entwicklungsstadium zeigt der überwiegende Teil der Kolonie eine sehr lockere, unregelmäßig netzartige Struktur mit erheblichen Lücken im Gefüge, wie sie sich ähnlich, aber regelmäßiger, für fixierten Agarnährboden mit seinem hohen Wasseranteil ergibt. Neben wenigen guterhaltenen vegetativen Zellen und atypischen Formen stellen Sporen das Hauptkontingent an lebenden Bauelementen in diesem lockeren Netzwerk dar. Der übrige Volumenanteil besteht aus Schleim und zerfallenen Materialien, die durch Fixation und nachfolgende Entwässerung zu dieser Netzstruktur umgewandelt werden, in der die Lücken durch Schrumpfung überwiegen. Trotzdem sind darin noch Andeutungen der ehemaligen Schichtung erhalten geblieben.

Nicht mehr zu erkennen ist die ehemalige Basalschicht, während die lockere und stark versporte einstige Mittelschicht jetzt den größten Teil der Koloniehöhe bedeckt. In ihrem oberen Bereich finden sich deutlich Reste des bogigen Strangverlaufes. Den Abschluß nach oben bildet die besonders nach den Rändern zu sehr dichte und kompakte ehemalige Deckschicht aus komprimierten zerfallenen Zellen und Schleim, in der auch noch Reste der Struktur erhalten sind. Mit der Sporenfärbung nach KLEIN

wird sie rötlich angefärbt. Vereinzelt finden sich darin Sporen und zerfallende vegetative Zellen.

Randwärts im Bereich des Profilabfalles endet diese Schichtung. Neben kurzen und dicken Zellen kommen atypische Formen, Sporen und rötlich angefärbte Zellreste vor. Der dünne Zuwachsrand besteht fast ausschließlich aus dicken, klumpig-dicht liegenden Stäbchen und zeigt eine deutliche Wellenstruktur dünner Zellketten und -stränge, die abwechselnd längs oder quer angeschnitten sind. Bis in die äußersten Ausläufer ist Versporung eingetreten.

Den auffälligen Granula der lebenden Kolonien entspricht das Sekundärwachstum in der dominierenden, stark versporten Mittelschicht. Diffus verteilt ist es oft nur schwer von primären Zellen bzw. deren Resten abgrenzbar, um in Form kompakter Sekundärkolonien um so deutlicher in Erscheinung zu treten. Diese sind im basalen Bereich am stärksten ausgedehnt und wachsen von dort nach oben mehr oder weniger weit in das Kolonieinnere oder befinden sich unter der Deckschicht. Diese wird zwar teilweise locker durchwachsen, aber in keinem Falle durchbrochen, so daß die Sekundärkolonien nie knopfartig die obere Begrenzung überragen, wie es bei Bacillus subtilis der Fall ist. Die Bauelemente der Sekundärkolonien färben sich stark blau an und sind von länglicher bis rundlicher Gestalt. Teilweise scheinen sie geschrumpft oder unregelmäßig kollabiert zu sein. Die Zellen innerhalb der Sekundärkolonien sind meist recht dicht gelagert und zeigen deutliche Ketten- oder Strangbildung mit Verflechtungen und Wellenstrukturen.

5.3.1.5 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 8,5 mm Durchmesser und sehr breitem, unregelmäßigem Zuwachsrand. Ober-

fläche schleimig glänzend, uneben, mit wenigen undeutlichen Granulierungen.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125fach): Sehr gealterte und zusammengefallene Kolonie von 8,0 mm Durchmesser und einer maximalen, über weite Strecken etwa gleichbleibenden Höhe von 0,07 mm. Profil leicht gewellt und an den Rändern langsam abfallend. Ungleich breiter, dünner Zuwachsrand.

Der Aufbau dieser allerdings stark gealterten Kolonie ähnelt in großen Zügen dem der Entnahme nach 20 Tagen. In dem Basal- und Mittelschicht entsprechenden Kolonieteil kommen neben den dominierenden, meist schwach anfärbbaren Sporen nur noch Zellreste sowie deutlich gealtertes Sekundärwachstum vor. Diese Schicht ist, wie auch bei der vorhergehenden Entnahme, sehr locker unregelmäßig netzartig strukturiert, und die artefiziellen Lücken haben noch an Häufigkeit zugenommen.

Den Abschluß nach oben bildet eine sehr dichte Deckschicht von etwa gleichbleibender Dicke, die erst zu den Rändern des Koloniekörpers hin abnimmt und nach der Sporenfärbung rötlich erscheint. Feine lamellenartige Lücken deuten noch den ehemaligen Verlauf von Längssträngen an. Nur im unteren Übergangsbereich finden sich vereinzelt Sporen.

Der flache Zuwachsrand außerhalb des Koloniekörpers besteht aus Ketten dicker, stark anfärbbarer Stäbchen, die wellenartig angeordnet sind. Das innerste Drittel des Zuwachses ist stark versport.

Der Sekundärwuchs aus stark anfärbbaren, dicklichen Zellen durchzieht die Kolonie unregelmäßig und meist in diffuser Form. Eigentliche Sekundärkolonien sind nur noch undeutlich erkennbar und bereits stark in Zerfall befindlich. Vereinzelt konnten auch flache, sekundärkolonieartige Zellansammlungen von geringer Ausdehnung auf bzw. im obersten Teil der Deckschicht beobachtet werden.

Es seien noch zwei Feststellungen angeführt, die als Hinweis dafür

angesehen werden können, daß auch Sekundärwuchs erneut zur Versporung befähigt ist. Einmal fanden sich in der Deckschicht Sporen nur innerhalb von älterem Sekundärwuchs. Zum anderen fiel auf, daß das Gros der Sporen aus primären vegetativen Zellen im übrigen Kolonieteil zumeist undeutlich konturiert war und sich die Sporen mit der Sporenfärbung nur mäßig stark darstellen ließen. Hingegen waren Sporen innerhalb von zerfallenden Sekundärkolonien und in deren unmittelbarer Umgebung stets deutlich in den Konturen und auffällig stärker gefärbt. In beiden Fällen liegt es nahe anzunehmen, daß diese Sporen aus sekundären Zellen stammen.

5.3.2 Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar:

5.3.2.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Diese Mikrokolonien zeigen in den jüngsten Stadien einen eigentümlichen Aufbau, der von dem des Bacillus subtilis abweicht. Die Teilungsprodukte lassen hier anfangs kaum eine Unterteilung in Einzelzellen erkennen, so daß lange, schlangenartige Fäden entstehen, die Schleifen bilden und sich gegeneinander verschieben und verschlingen, ohne zu zerfallen. Diese Erscheinung war in weitaus geringerem Maße auch bei den Mikrokolonien auf Bouillon-Pepton-Agar zu beobachten.

Schon früh überlagern sich die Fäden und bewirken so Höhenwachstum bereits in einem Stadium ohne größere Flächenausdehnung. Im Laufe der Weiterentwicklung treten zunehmend "normale", in Einzelzellen von 9,0 x 1,6 µ unterteilte Ketten auf, die nur selten in Einzelzellen oder kürzere Bruchstücke zerfallen. Besonders im Zentrum der Mikrokolonie vereinigen sie sich zu dicken Strängen in der charakteristischen welligen Anordnung, die ein erhebliches Höhenwachstum bewirken. Der

Kolonieumriß wird mit zunehmendem Alter weitgehend abgerundet, wenngleich die Randregion zahlreiche Unebenheiten in Form von fädigen oder lappigen Auswüchsen aufweist, die aber für die Makrokolonien nicht formbestimmend werden.

5.3.2.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Dicke, rundliche Kolonie von matt weißer Farbe, Durchmesser etwa 1,7 mm. Oberfläche fein gekörnt, Rand kaum merklich rauh.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125fach): Kolonie von 1,4 mm Durchmesser und maximal 0,03 mm Höhe. Profil mäßig gewellt und vom Zentrum her langsam nach außen abfallend.

Es zeigt sich das typische Bild einer jungen Kolonie von einheitlichem Aufbau ohne Schichtenbildung oder andere Differenzierungen. Das mäßige Breitenwachstum dürfte auch auf den Mangelnährboden zurückzuführen sein. Zellen von unterschiedlicher Länge, im Durchschnitt aber 4,0 x 1,0 µ, sind zu Ketten und diese zu Strängen verbunden, die miteinander in flachen Wellungen ein dichtes Geflecht bilden.

Mit der Sporenfärbung ist kein deutlicher Beginn einer Versporung zu erkennen. In der Randzone fallen in den Zellen je eine oder mehrere nicht angefärbte Vakuolen auf.

5.3.2.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche, schleimig-glänzende Kolonie mit weiß-opakem Zentrum und glasigem Zuwachsrand, der eine feine "radspeichenartige" Struktur zeigt. Durchmesser etwa 5,0 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125fach):

Flache Kolonie von einheitlichem Aufbau, mit breitem, dünnen Zuwachsrand. Durchmesser etwa 4,4 mm und 0,03 mm maximale Höhe. Profil leicht gewellt, allmählich abfallend und in den Zuwachsrand übergehend.

Bereits in diesem Stadium dürfte das Wachstum dieser flachen und einförmigen Kolonie fast beendet sein, und erhebliche Alterungserscheinungen bestimmen das Bild. Bis zum Zuwachsrand ist starke Versporung eingetreten, wobei die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Sporen auffällt. Der lockere Kolonieaufbau aus überwiegend Sporen und zerfallenem Zellmaterial ähnelt dem um 10 Tage älteren Stadium von Bacillus mesentericus auf Bouillon-Pepton-Agar, ohne aber dessen Differenzierungen aufzuweisen. Vereinzelt finden sich, etwa gehäuft im Zuwachsrand, dickliche, stark anfärbbare Zellen.

5.3.2.4 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Die Befunde dieser Entnahme ähneln weitgehend der vorgenannten nach 10 Tagen. Im makroskopischen Koloniebild ist ein Konfluieren aller Kolonien der Schale durch Ausbreiten des dünnen Zuwachsrandes eingetreten, auf den die Versporung jetzt auch übergegriffen hat. Es fällt auf, daß von den wiederum sehr unterschiedlich stark angefärbten Sporen die dunkelsten sich im oberen Teil der Kolonie befinden.

5.3.3 Oberflächenkolonien aus Multipunktatorbeimpfung von Sporenaufschwemmung auf Bouillon-Pepton-Agar + 1,0 ‰ Chloramphenicol/ml bei Zimmertemperatur.

Parallel zu Bacillus subtilis auf dem gleichen Substrat waren nach 1 Tag nur feinste tröpfchenartige Kolonien, allerdings hier auf jedem Impfpunkt, gewachsen. Im Alter von drei Tagen hatten sich diese zu kompakten

Kolonien entwickelt, und mit 15 Tagen betrug deren Durchmesser im Mittel 5,0 mm. Die Kontrollbeimpfung auf Bouillon-Pepton-Agar ohne Chloramphenicol zeigte bereits nach 1 Tag ein kompaktes Koloniewachstum. Nach 15 Tagen maßen diese Kolonien im Durchmesser etwa 7,8 mm.

Makrokolonie nach 15 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche opake Kolonie von etwa 5,0 mm Durchmesser mit unebener Oberfläche und einer medianen Vertiefung. Sehr flacher, außen fein gezähnter bis faseriger Zuwachs.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Profil entspricht dem makroskopischen Bild. Randwärts höchste Erhebungen von maximal 0,04 mm, die langsam an Höhe nach außen abnehmen und in sehr flachem Zuwachs enden. Zentrum eingesenkt. Durchmesser 4,9 mm.

Einzelheiten der Koloniestruktur sind nur undeutlich zu erkennen, da unter weitgehendem Zerfall der Zellen ein erheblicher Grad an Alterung erreicht ist. Am besten ist deshalb auch der äußerste Zuwachs als jüngster Kolonieteil erhalten, der aus Zellen von im Mittel 3,0 x 1,1 µ besteht und stark mit Sporen von 2,0 x 0,9 µ durchsetzt ist.

Der Koloniekörper ist undeutlich aus mehreren Schichten aufgebaut, die jeweils verschieden stark versport sind. In der kräftig anfärbbaren Basalschicht liegen die Zellreste sehr dicht, und in dieser sind die meisten Sporen anzutreffen. Etwas lockerer, schwächer versport und weniger stark angefärbt erscheint die Mittelschicht. In dieser sind noch Andeutungen von Zellsträngen zu erkennen, die horizontal bis schräg ausgerichtet scheinen und stark mit artefiziellen Lücken durchsetzt sind. Zwischen den beiden vorgenannten liegt noch eine sehr flache, beinahe bandartige Schicht, welche die Kolonie in wechselnder Höhe durchzieht. Dementsprechend verändern sich auch die Höhen der Basalschicht und Deckschicht. Mit der Sporenfärbung nach KLEIN färbt sich diese Zwischenschicht, die noch locker stark zerfallene Zellreste enthält, kräftig rot und scheint vor allem aus Schleim zu bestehen. Vermutlich entspricht sie einer sog. "komprimierten Zerfallschicht", wie sie z.B. bei älteren

Kolonien von Bacillus cereus (Glatt-Variante) festzustellen war.

Am stärksten zerfallen ist die mit Schleim durchsetzte Deckschicht und läßt dementsprechend kaum Strukturreste erkennen. Beim Vergleich mit der Kontrolle ergeben sich hinsichtlich der Lokalisierung der Sporen grundlegende Abweichungen von der Norm, und die Koloniegentwicklung zeigt vor allem zu Beginn eine deutliche Hemmung.

5.3.4 Oberflächenkolonien aus Multipunktatorbeimpfung von Sporenaufschwemmung auf Bouillon-Pepton-Agar + 5 I.E. Penicillin/ml bei Zimmertemperatur.

Einen Tag nach der Beimpfung waren nur auf 29 von insgesamt 43 Impfpunkten bereits kompakte Kolonien gewachsen, deren Größe von eben mit dem bloßen Auge erkennbar bis zu einem Durchmesser von maximal 3,4 mm reichte. Nach 15 Tagen hatten sich 35 Kolonien von immer noch unterschiedlicher Größe, aber weitgehend gleichem Aussehen, entwickelt. Die größten von ihnen entsprachen im Durchmesser etwa denen der Kontrolle, die bereits unter 5.3.3 beschrieben wurde.

Makrokolonie nach 15 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Runde Kolonie mitopakem Koloniekörper und einem breiten, durchscheinenden Zuwachsrand, dessen äußere Begrenzung fein faserig bis gezähnt ist. Durchmesser 4,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Das Profil entspricht dem makroskopischen Bild. Wenig differenzierter Aufbau mit etwas unebener Oberfläche und einer maximalen Höhe von 0,04 mm. Durchmesser 4,3 mm.

Die Kolonie ist recht gleichmäßig aufgebaut aus langen Ketten von Zellen (im Mittel 4,0 x 1,0 µ), die randwärts in dicken Strängen gut erhalten sind und eine leicht wellige Anordnung meist im Längsschnitt zeigen.

Starke Versporung reicht durch die gesamte Kolonie bis in die äußersten Ausläufer des Zuwachses aus kurzen, dicken Zellen von gutem Erhaltungszustand. Dort sind die Sporen unterschiedlich stark angefärbt. In den Randpartien des Koloniekörpers liegen die Sporen gehäuft in der oberen Hälfte. Dagegen sind im Zentrum der Kolonie kaum noch Struktureinzelheiten zu erkennen, und hier befinden sich die gleichmäßig angefärbten Sporen in dichter Anordnung über die gesamte Höhenausdehnung verteilt.

Gegenüber der Kontrolle fällt die geringe Differenzierung der Koloniestruktur auf. Obwohl das Wachstum unter Penicillineinfluß stand und vor allem anfangs eine starke Hemmung zeigte, scheint der zelluläre Aufbau und das Versporungsvermögen der Zellen normal zu sein und entspricht somit den Befunden der Kolonie unter Chloramphenicol-Einfluß.

5.4 Bacillus cereus

5.4.1 Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar:

5.4.1.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Die Zellen dieser ausgesprochen rauh wachsenden Form messen in den jungen Mikrokolonien im Mittel 12,0 x 2,0 µ, sind also vergleichsweise lang und dick. Bei der Teilung zeigen sie eine Tendenz zur Bildung sehr langer Ketten aus etwa 10 oder mehr Einzelzellen mit starkem Zusammenhalt. Die ersten Mikrokoloniestadien sind daher fädig und breiten sich meist linear über die Nährbodenoberfläche aus. Hindernisse wie z.B. Substratunebenheiten und später vor allem Zellen und Zellverbände der eigenen Kolonie, bewirken Krümmungen der Zellketten, deren Zerfallen sowie rückläufiges Wachstum, so daß im Zentrum bald eine Anhäufung von parallel gelagerten Kettengruppen unterschiedlicher Ausrichtung erfolgt,

die nach und nach die Lücken zwischen dem anfangs sehr lockeren Gerüst ausfüllen und rundliche Umrisse entstehen lassen. Infolge der Starrheit der Zellketten und ihrem Zusammenhalt zerfallen diese nicht immer durch Hindernisse, ändern ihre Richtung oder legen sich parallel dazu, sondern überwachsen diese auch und lassen so bereits in frühen Stadien einen mehrschichtigen Aufbau ohne zentrale Lokalisation entstehen.

Bedingt durch die Länge der Einzelzellen und die Starrheit der Zellketten neigt Bacillus cereus in der rauhen Form zur Bildung von flachen und ausgebreiteten Mikro- wie Makrokolonien. Der Kolonieumriß ist im Zentrum dann zwar rundlich, aber die äußere Begrenzung hat ein meist sehr unregelmäßiges Aussehen und wird durch Ausläufer fädiger bis lappiger Form bestimmt, die Ähnlichkeit mit Bacillus mycoides-Kolonien haben können.

Mit zunehmendem Alter wird der Aufbau der Mikrokolonien aus vor allem in der Horizontalen gewellten und gefalteten mächtigen Zellsträngen immer deutlicher.

5.4.1.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche und flache Rauh-Kolonie von etwa 9,5 mm Durchmesser. Oberfläche matt, körnig bis fädig und Rand faserig.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x) : Sehr flacher, einförmiger Aufbau. Durchmesser etwa 8,8 mm und maximale Höhe in der Mitte 0,02 mm. Obere und basale Koloniebegrenzung uneben, Profil vom Zentrum allmählich abfallend.

Die Einzelzellen sind, soweit deutlich abgegrenzt erkennbar, im Mittel mit 5,9 x 1,0 µ etwa um die Hälfte kleiner als in den Mikrokolonien bei Lebendbetrachtung. Diese auffällige Differenz dürfte nicht allein als artefizielle Schrumpfung zu deuten sein, da sich auch anderweitig erheb-

liche Unterschiede in Größe und anderen Eigenschaften der Zellen von Mikro- und Makrokolonien feststellen ließen.

Beim Vergleich mit Bacillus subtilis und pumilus deutet sich bereits in diesem frühen Stadium gegenüber jenen im Kolonieaufbau eine erhebliche Einförmigkeit an. Es ist keinerlei Schichtung oder der Beginn einer solchen zu erkennen. Lediglich im Zentrum ist die Basis noch dichter als im übrigen Teil der Kolonie. Wegen der engen Verflechtung der Zellen und Zellketten zu dichten Strängen sind in den Präparaten Einzelheiten der Struktur oft nur undeutlich zu erkennen und fotografisch nicht darstellbar. Trotzdem ist das grundsätzliche Aufbauprinzip das gleiche geblieben, wie es bereits an der Mikrokolonie in vivo zu sehen war: Dicke Zellstränge sind überwiegend in horizontaler Ebene in weiten Windungen angeordnet und deshalb im Schnitt zumeist als Längs- bzw. Querschnitte getroffen. Die verhältnismäßig geringe Höhe der Kolonie läßt bei den beachtlichen Ausmaßen der Zellketten und deren Starrheit wohl kaum ausgeprägte wellige Strangverläufe in der Vertikalen zu.

Bei den nach KLEIN gefärbten Präparaten fällt auf, daß vor allem die Zellen der noch stark wachsenden und sich flächig ausdehnenden Randregion meist mehrere helle, vakuolenartige Stellen aufweisen, während sie mit der Viktoriablau-Färbung allein "leer" erscheinen. Der Beginn einer Versporung war in diesem Stadium noch nicht zu erkennen.

5.4.1.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Über den sich stark ausbreitenden flachen Zuwachs sind die Kolonien der Schale miteinander konfluiert. Der zentrale Teil ist rundlich, mit dunklerer, leicht erhabener Mitte. Oberfläche grießartig. Durchmesser etwa 4,6 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Kaum Veränderungen gegenüber der Entnahme nach 2 Tagen, sehr flacher Zuwachsrand. Durchmesser etwa 4,0 mm und Höhe maximal in der Mitte 0,02 mm.

Beim Vergleich mit der zwei Tage alten Kolonie ergeben sich keine weiteren Strukturdifferenzierungen. Deutlich wird der Beginn der Alterung, indem die einzelnen Zellen unscharf abgegrenzt, besonders im Bereich der oberen wie der basalen Begrenzung der Kolonie verklumpt und entsprechend dunkler angefärbt sind. In der Basis, vor allem aber im dünnen Zuwachsrand, finden sich atypische Zellen von blasiger, rundlicher Gestalt, die sich stark anfärben lassen.

Es ist Versporung eingetreten, die sehr gering über den gesamten erhabeneren, zentralen Teil der Kolonie verstreut ist und diesen im oberen Drittel der Höhenausdehnung verstärkt schichtartig durchzieht. Die Sporen messen 1,6 x 0,8 µ und färben sich kräftig an.

5.4.2 Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar:

5.4.2.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Die jungen Mikrokoloniestadien auf Weizengrießagar ähneln denen auf Bouillon-Pepton-Agar. Allerdings zeigen die Zellen die Eigentümlichkeit, bei der Teilung lange "Fäden" von 1,6 µ Durchmesser zu bilden, die nur sehr selten eine Unterteilung erkennen lassen. Dieselbe Erscheinung war bereits bei Bacillus pumilus zu beobachten, während sie hier aber im Gegensatz zu diesem auch für die älteren Mikrokoloniestadien erhalten bleibt.

Die fädigen Zellverbände bilden schon frühzeitig enge Verschlingungen ineinander und schieben sich zu parallel angeordneten Lagen zusammen. Da es wegen des abweichenden Teilungsmodus relativ wenige freie Enden gibt, überlagern sich mit zunehmendem Wachstum ganze Flächen aus parallelen Fäden bzw. drücken Teile im Innern an verschiedenen Stellen nach oben

und bewirken so schon früh ein Höhenwachstum. Es läßt sich gut am Lebendpräparat beobachten, wie die Spannung in den wachsenden, ineinander verschlungenen parallelen Fäden zu wachsen scheint, bis diese so groß wird, daß Teile im Zentrum solcher Anordnungen geradezu ruckartig nach oben gedrückt werden. So entstehen zunehmend erhabenere Stränge ähnlich wie auf Bouillon-Pepton-Agar, die dicht ineinander verschlungen sind und vor allem in horizontaler Ebene ihre charakteristischen Windungen zeigen. Die Mikrokolonien runden sich im Zentrum immer mehr im Umriß ab, während die Ränder durch meist lappige Ausläufer unregelmäßig gestaltet sind.

5.4.2.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Dickliche, weiße Kolonie von etwa 5,2 mm Durchmesser. Grießartige, matte Oberfläche und rauher, faseriger Rand.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht 125 x) : Profil in der Mitte eingefallen und etwas unregelmäßig gestaltet durch vermutlich artefizielle Schrumpfung. Nach außen langsame Abnahme an Höhe, die maximal 0,05 mm beträgt. Einheitlicher Aufbau. Durchmesser etwa 4,9 mm.

Diese erste Makrokolonieentnahme läßt an vielen Stellen des Schnittes den typischen Aufbau aus Zellketten mit deutlich abgegliederten Einzelzellen erkennen, während die ältesten Mikrokolonien bei Lebendbetrachtung und zusätzlicher Untersuchung mit der Öse entnommenen Materials aus überwiegend fädigen Verbänden ohne Untergliederung in Zellen bestanden. Es muß also ein später Übergang vom atypischen "fädigen Zellwachstum" zur typischen Zellteilung mit Septenbildung stattgefunden haben, der aber nicht beobachtet werden konnte.

Die Einzelzellen messen im Mittel 4,0 x 1,0 µ. Im Kolonieschnitt sind keine abgegrenzten Schichten zu erkennen. Es dominieren Stränge aus

Zellketten in mächtigen Windungen und Verflechtungen in horizontaler, aber auch vertikaler Ebene, die eine größere Höhenausdehnung als auf Bouillon-Pepton-Agar bewirken.

In der oberen Hälfte der Kolonie setzt bereits in diesem frühen Stadium starke Versporung ein, die bis zum Zuwachsrand reicht. Wie auf Bouillon-Pepton-Agar messen die Sporen auch hier etwa 1,6 x 0,8 µ.

5.4.2.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Flache, schleimig-glänzende und opake Kolonie, die mit den benachbarten über den hauchdünnen Zuwachsrand verbunden ist. Durchmesser etwa 5,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x) : Maximale Höhe von etwa 0,02 mm im Zentrum. Von dort nach außen langsamer Profilabfall mit sehr flachem Zuwachsrand. Durchmesser etwa 5,1 mm.

Wenngleich die Höhen unterschiedlich großer Kolonien aus verschiedenen Stadien nur mit Vorsicht in eine Relation gesetzt werden dürfen, scheint mit dieser Entnahme bereits eine leicht zusammengefallene und verdichtete, auf jeden Fall stark gealterte, Kolonie vorzuliegen. Auch im Zuwachs sind die Strukturen nur undeutlich als gewellte Zellstränge zu erkennen. Der Koloniekörper zeigt starke Versporung, wobei deren Maximum in der oberen Koloniehälfte liegt. Die Sporen sind oft nur undeutlich angefärbt und typische vegetative Zellen kaum noch zu erkennen. Neben Massen von Sporen und zerfallenen Zellresten finden sich vor allem in der oberen Region und zunehmend nach außen dickliche Zellen von etwa doppeltem Durchmesser der typischen Formen, die sich entweder sehr dunkel rötlich bis bläulich anfärben oder aber den Farbstoff kaum annehmen. Letztere sind schwer von artefiziellen, blasigen Strukturen in der schleimigen Grundsubstanz der Kolonie zu unterscheiden.

5.4.2.4 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Keine merklichen Veränderungen zur vorhergehenden Entnahme. Durchmesser etwa 4,2 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Einheitlich stark gealterte Kolonie mit geringfügig eingesenktem Zentrum. Flaches Profil allmählich abfallend, mit breitem, dünnen Zuwachsrand. Etwa 3,8 mm im Durchmesser und maximal 0,03 mm hoch.

Der Kolonieaufbau ähnelt sehr dem vorgenannten Stadium. Die Alterung ist so fortgeschritten, daß keine Andeutungen der ursprünglichen Wellenstruktur aus dicken Zellsträngen mehr zu erkennen und typische wie atypische Zellen weitgehend zerfallen sind. Die untere Koloniehälfte weist bei sonst dichtem Gefüge zahlreiche kleinere artefizielle Lücken auf. Sehr starke Versporung von unterschiedlicher Anfärbung durchzieht die Kolonie und häuft sich in der oberen Koloniehälfte, die auch die meisten kräftig angefärbten Sporen aufweist.

5.4.3 Oberflächenkolonien aus Multipunktatorbeimpfung von Sporenaufschwemmung auf Bouillon-Pepton-Agar + 1,0 ɣ Chloramphenicol/ml bei Zimmertemperatur.

Im Gegensatz zu Bacillus subtilis und pumilus unter Hemmstoffeinfluß fehlte 1 Tag nach der Beimpfung jedliches makroskopisch erkennbare Wachstum. Erst nach 4 Tagen wurden kleine kompakte Kolonien an 8 Impfpunkten sichtbar, die nach 15 Tagen noch unterschiedliche Größe zeigten, wobei deren größte einen Durchmesser von 6,8 mm erreichte. Dagegen wuchsen auf der Kontrollbeimpfung bereits nach 1 Tag typische rauhe Bacillus cereus-Kolonien, die nach 15 Tagen einen Durchmesser von im Mittel 9,7 mm hatten.

Makrokolonie nach 15 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Runde, dicke und opake Kolonie mit schmalem, glattrandigem Zuwachs. Durchmesser 2,7 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Profil etwa dem makroskopischen Bild entsprechend, aber deutlich ungleiche Schnitthälften. Höchste Erhebung von 0,11 mm dezentriert links im Schnitt. Profil allmählich abfallend und als schmaler und flacher Zuwachs auslaufend. Im Zentrum deutliche Schichtung. Durchmesser 2,4 mm. Rechts der Mitte begrenztes Tiefenwachstum von maximal 0,08 mm in das Substrat.

Die geringe Flächenausdehnung bei relativ starkem Höhenwachstum weicht von dem für Bacillus cereus in der Rauhform gewohnten Koloniebild erheblich ab. Alterung der Zellen setzt erst vom Zentrum her schwach ein, so daß der zelluläre Aufbau insgesamt gut zu erkennen ist.

Das Koloniezentrum zeigt eine Schichtung, deren Basalschicht am dichtesten aus dicken, etwas unregelmäßig gestalteten und oft gekrümmten Bauelementen verflochten ist und nur sehr vereinzelt Sporen enthält. Es folgt eine "komprimierte Zerfallsschicht" ähnlich wie bei Bacillus pumilus, die sich mit der Sporenfärbung rötlich anfärbt und überwiegend aus Schleim bestehen dürfte. Vereinzelt finden sich darin Sporen von 1,6 x 0,8 µ.

Den meisten Raum nimmt die Mittelschicht ein aus gleichmäßigen und geraden Zellen von im Mittel 4,0 x 0,8 µ, die lange Ketten und dicke Stränge mit welligem Verlauf bilden. Andeutungsweise sind diese Stränge in der Koloniemitte etwa senkrecht ausgerichtet und nach außen hin zunehmend geneigt. Sporen finden sich in der Mittelschicht meist unregelmäßig verstreut und nur selten dichter in nestartiger Anordnung.

Die flache und sehr dichte Deckschicht besteht aus Zellsträngen von geringem Durchmesser, die im Schnitt abwechselnd in Längs- und Querschnitten erscheinen. Geringe Versporung ist nur in den randwärts gelegenen Teilen zu erkennen.

Diese Schichtung endet mit dem Beginn der Höhenabnahme zum Rande

hin und wird in der rechten Schnitthälfte früher als in der linken undeutlich. Der Kolonieaufbau setzt sich nach außen mit dicken Strängen von der Mittelschicht her fort, die hauptsächlich in vertikaler Ebene gewunden sind und allmählich in den flachen Zuwachs übergehen. Letzterer ist bis zum äußersten Rand locker versport.

Das Tiefenwachstum besteht aus meist unregelmäßig gekrümmten, dicken Zellen und gewundenen Ketten, die nahe der Nährbodenoberfläche bereits stark zerfallen und dementsprechend schwach anfärbbar sind. Weiter in das Substrat hinein liegen sie dichter miteinander verschlungen oder klumpig aggregiert mit vereinzelten versporten Zellen.

Die Kontrolle läßt im Schnitt eine flache Kolonie ohne deutliche Schichtung mit unregelmäßiger Wellenstruktur erkennen. Versporung ist auf die obere Koloniehälfte beschränkt und fehlt in Zuwachsbereich. Damit weichen die vorgenannten Befunde von der Kontrolle erheblich ab, ohne aber nach anfänglich starker Entwicklungshemmung im Kolonieaufbau ein aberrantes Bild zu geben.

5.4.4 Oberflächenkolonien aus Multipunktatorbeimpfung von Sporenaufschwemmung auf Bouillon-Pepton-Agar + 1 I.E. Penicillin/ml bei Zimmertemperatur.

Von den 43 Impfpunkten des Multipunktators waren nach 1 Tag nur auf 11 von diesen Kolonien unterschiedlicher Größe gewachsen, deren Anzahl sich auch nach 15 Tagen nicht geändert hatte. Die schleimig-glänzenden und opaken Kolonien mit unregelmäßigem Umriß und durchscheinenden Zuwachs besaßen einen Durchmesser von im Mittel 12,0 mm und übertrafen damit als Folge der geringen gegenseitgen Hemmung durch den Ausfall von 32 Kolonien die Kontrollbeimpfung. Von deren typischen Cereus-Kolonien unterschieden sie sich makroskopisch auffällig (siehe 5.4.3).

Makrokolonie nach 15 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Schleimig-glänzende, opake Kolonie von rundlicher Form und einem Rand aus kurzen, lappigen Ausbuchtungen mit durchscheinendem Zuwachs. Der den benachbarten Kolonien zugewandte Teil durch Hemmung flacher als der übrige. Durchmesser 9,8 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Größtenteils flache Kolonie von etwa 0,05 mm Höhe, die zum rechten Ende des Schnittes hin auf maximal 0,11 mm ansteigt und in diesem Bereich einen geschichteten Aufbau zeigt. Äußerster Kolonierand in Form sehr flachen Zuwachses. Durchmesser 9,5 mm.

Der unterschiedliche Aufbau dieser großflächigen Kolonie läßt eine Unterteilung in mehrere Zonen zu. Die relativ einheitlichen Zellen messen im Mittel 4,5 x 1,0 µ.

In der sehr flachen Zuwachszone sind die Bauelemente etwas kürzer, zu Ketten verbunden und starkt versport. Sie erscheinen abwechselnd längs und quer angeschnitten in Ketten und liegen demnach wellig in horizontaler Ebene. Im Kolonieschnitt wechselt diese Anordnung mit zunehmender Höhe zu dicken Strängen, die in kräftigen Wellenlinien und Wirbeln vor allem in vertikaler Ebene verlaufen und so überwiegend in Längsschnitten erscheinen. Sporen kommen in der Zuwachszone gleichmäßig verteilt vor.

In Richtung auf das Koloniezentrum, nachdem eine vorerst etwa gleichbleibende Höhe erreicht ist, wird die Struktur aus gewellten Strängen zunehmend undeutlicher, und die unscharf konturierten Zellketten sind zu einem dichten Netzwerk verflochten, das nur noch in seiner oberen Hälfte versport ist. Dieser Aufbau zeigt bereits erhebliche Alterung und reicht über das Koloniezentrum hinaus, bis das Profil erneut ansteigt und die wellige Struktur wieder deutlich erkennbar wird.

In dieser Randzone erreicht die Kolonie ihre größte Höhenausdehnung und Differenzierung in Form eines geschichteten Aufbaus, der etwa den vorgenannten Befunden von Bacillus cereus unter Einfluß von

Chloramphenicol entspricht. Der flachen, dichten und stark anfärbbaren Basalschicht mit starker Versporung folgt eine noch junge und oft nur andeutungsweise vorhandene "komprimierte Zerfallsschicht" geringer Höhe, die aus undeutlich konturierten Zellresten in horizontaler Ausrichtung besteht.

In der Mittelschicht mit der größten Höhenausdehnung sind die Zellstränge in ihrem welligen Verlauf so stark zusammengeschoben, daß sie eine undeutlich senkrechte Orientierung angenommen haben und oben stark bogig miteinander verbunden sind. Im Zentrum dieser Zone ist die Mittelschicht schwach versport.

Den Abschluß nach oben bildet eine schwach versporte Deckschicht, die an der äußeren Begrenzung aus besonders dicht gelagerten und bereits stark zerfallenen Zellen besteht und sich dort besonders kräftig anfärbt.

Mit abnehmender Koloniehöhe endet für diese Zone auch der geschichtete Aufbau, und stark gewundene Zellstränge, die zumeist im Längsschnitt erkennbar sind, reichen bis zum Beginn des flachen Zuwachses.

Die makroskopisch wie im Schnitt erhabene Randregion entspricht dem Teil, der nicht durch benachbarte Kolonien in seinem Wachstum gehemmt war.
Für das Koloniewachstum ergibt sich zu Beginn totale oder partielle Hemmung. Die Befunde für die gesamte Kolonie weichen mehr oder weniger stark von der Norm und der Kontrolle ab, ohne aber eigentlich vom zellulären Aufbau und der Sporenbildung her aberrant zu sein.

5.5 Bacillus cereus (Glatt-Variante)

5.5.1 Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar:

5.5.1.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Die Glatt-Variante von Bacillus cereus konnte während zahlreicher Überimpfungen der typischen Rauhform nur einmal auf BPA in Form einer Kolonie festgestellt werden und ließ sich von dieser weiterführen.

Die Bauelemente der Mikrokolonien maßen im Mittel 8,0 x 1,6 µ. Das Verhalten der Teilungsprodukte zeigt einen deutlichen Unterschied zur Rauhform, indem die Zellketten sehr leicht auseinanderbrechen. Durchschnittlich blieben nur Bruchstücke aus 5 Zellen erhalten, die eine geringe Starrheit und wenig Zusammenhalt aufweisen. Vereinzelt finden sich in den Kolonien auch die bei anderen Bacillen auftretenden fädigen Formen ohne erkennbare Untergliederung in Einzelzellen, deren Durchmesser etwas größer erscheint als der der typischen Zellen.

Die weitere Kolonieentwicklung ähnelt den Gegebenheiten bei Bacillus subtilis, die unter 5.2.1.1 beschrieben wurden. Es bilden sich einschichtige Zellflächen aus mosaikartigen Gruppen parallelgelagerter Zellketten in verschiedenen Winkeln zueinander. Mit zunehmender Flächenausdehnung runden sich diese Ab. Die einzelnen Zellketten zerfallen dann vermutlich durch den Halt der sie umgebenden Zellen in geringerem Maße, während vom Zentrum her weitere Schichten nach oben gedrückt werden. Damit beginnt das Höhenwachstum der Kolonie, das hier im Gegensatz zur Rauhform beträchtliche Ausmaße erreichen kann. Die Zellketten vereinigen sich später zu dicken Strängen, die zuerst in der charakteristischen welligen Anordnung in horizontaler und später auch in ausgeprägt vertikaler Ebene verlaufen.

5.5.1.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Erhabene rundliche Kolonie mit glatter Oberfläche und scharfem Rand. Teigige Konsistenz. Durchmesser etwa 3,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x) : Dicke gewölbte Kolonie mit leicht gewelltem Profil. Durchmesser etwa 3,1 mm und maximale Höhe im Zentrum etwa 0,1 mm. Auffällige Schrumpfungsfalten in vertikaler Richtung.

In diesem Alter fehlt dem Kolonieaufbau noch jede Andeutung einer zukünftigen Schichtung. Lediglich im Zentrum sind die Zellen in Form einer netzartigen Verflechtung von der Basis nach oben zunehmend lockerer angeordnet. Hier sind auch noch Reste vertikaler Wellungen sehr dicker Stränge zu erkennen. Deutlicher wird diese Struktur zu den Rändern hin, wo die Stränge wegen der zugleich abnehmenden Koloniehöhe diese ganz ausfüllen und nun hauptsächlich in horizontaler Ebene gewunden sind. Die Einzelzellen messen im Mittel 3,2 x 1,2 µ, so daß deren Längs- oder Querschnitte im Bild nicht immer so deutlich voneinander differieren, als es bei einer größeren Länge im Verhältnis zum Durchmesser der Fall wäre.
Der Beginn von Versporung konnte nicht festgestellt werden.

5.5.1.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Erhabene rundliche Kolonie ähnlich der vorgenannten Entnahme. Durchmesser etwa 4,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Erhabene Kolonie, etwa gleichbleibende Höhe von maximal 0,1 mm. Profil an den Rändern schnell abfallend und mit schmalem, dünnem Zuwachs. Gleichmäßiger Aufbau aus Schichten, etwa auf halber Höhe entlang der Linie der stärksten Versporung auseinandergewichen. Durchmesser etwa 3,9 mm.

Die beginnende Alterung in diesem Stadium deutet sich, abgesehen von der Zellmorphologie, bereits an in der geringen Anfärbung des Koloniekörpers gegenüber dem Zuwachsrand.

Es liegt ein Kolonieaufbau vor, der etwa dem Prinzip der Dreischichtung (zwei dünne umgeben eine dicke mittlere bzw. Sporenschicht) entspricht, wie er für Bacillus subtilis und pumilus beschrieben wurde.

Auf die flache Basalschicht aus zarten, rundlichen und nur schwach anfärbbaren Zellen folgt zusätzlich eine sehr einheitliche "komprimierte Zerfallsschicht" (=KZS). Sie besteht aus stark zerfallenen und nicht versporten Zellen in sehr dichter Lagerung, die mit der Sporenfärbung nach KLEIN nur schwach rötlich angefärbt werden.

Mit etwa 2/3 der Gesamthöhe hat die Mittel- oder Sporenschicht die größte Ausdehnung und wird aus kurzen, dicken Zellen mit etwas undeutlichen Konturen in dichter Anordnung aufgebaut. Diese sind stark mit Sporen durchsetzt, die zumeist noch von Resten der Sporenmutterzelle umgeben sind und etwa 1,5 x 0,6 µ messen. Am dichtesten liegen die Sporen in der Mitte dieser Schicht, die dort wegen des geringen Zusammenhaltes ihrer losen Bauelemente auseinandergewichen ist.

Den oberen Abschluß bildet die verhältnismäßig flache Deckschicht mit lockerer und netzartiger, aber undeutlicher Struktur.

Dieser Aufbau durchzieht den größten Teil des Koloniekörpers, wo lediglich die Basalschicht fehlt, bis zum Beginn des starken Profilabfalles am Rande. Hier enden zuerst die "komprimierte Zerfallsschicht" und kurz darauf die Basalschicht, während sich Deck- und Mittelschicht vereinigen und mit nach außen deutlicher werdender Wellenstruktur ausbreiten. Sie sind, nach außen abnehmend, noch in der Mitte gering versport. Im äußersten Zuwachs fehlen Sporen, und dieser besteht aus deutlich abgegrenzten und gut anfärbbaren Zellsträngen, die im Schnitt längs und quer getroffen sind. In geringer Zahl kommen hier auch atypische

Zellen von größerem Durchmesser und kugeliger bis birnenförmiger Gestalt vor.

5.5.1.4 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 20 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche dicke Kolonie ähnlich denen der beiden vorhergehenden Entnahmen. Durchmesser etwa 4,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Profil mit flach herausragenden Erhebungen, deren mittelste mit maximal 0,24 mm die höchste ist und etwas dezentriert liegt. Von den beiden randwärts gelegenen Erhebungen aus erst allmählicher, dann rascher Profilabfall ohne dünnen Zuwachsrand. Durchmesser etwa 4,0 mm. Auffällige vertikale Schichtung.

In den Grundzügen des Aufbaus und der Schichtung entspricht diese Kolonie der vorgenannten Entnahme nach 10 Tagen. Der relative Anteil der einzelnen Schichten an der nun verdoppelten Gesamthöhe ist ungefähr gleich geblieben und die Basalschicht auch im Zentrum durchgehend ausgebildet.

Wichtige Veränderungen gegenüber der Entnahme nach 10 Tagen ergeben sich an der Mittel- oder Sporenschicht. Während die untersten beiden Schichten ineinander übergehen, ist die "komprimierte Zerfallsschicht" von der darüberliegenden Sporenschicht deutlicher abgesetzt. Letztere läßt eine Differenzierung in einen unteren und einen oberen Teil größerer Höhe erkennen. Der erstere dürfte am stärksten gealtert und am Zerfallen sein. Er besteht aus blasig-rundlichen Zellen mit nur geringer Anfärbung der Membranen in dichter Anordnung ähnlich der Basalschicht im unteren Bereich. Verstreut finden sich hier einzelne Sporen und nach oben zunehmende Bauelemente des größeren Teiles der Sporenschicht.

Beim Vergleich mit dem Stadium nach 10 Tagen fällt auf, daß nach 20

Tagen der Anteil der Sporen an den Elementen der gesamten Sporenschicht sehr gering ist. Die Sporen sind immer deutlich anfärbbar und zumeist mit Resten der Zellmembran umgeben. Daraus läßt sich schließen, daß ihre Entstehung jüngeren Datums sein wird, weil diese Reste mit zunehmendem Alter der Sporen zerfallen.

Den dominierenden Anteil am Aufbau des oberen und differenzierteren Teiles der Sporenschicht von etwa halber Gesamthöhe der Kolonie haben Zellen von atypischer und vielfältiger Form. Sie können dick-oval (maximal etwa 3,6 x 2,8 µ gegenüber "normalen" Zellen von im Mittel 3,2 x 1,2 µ) flaschen- bis birnenförmig oder auffällig gekrümmt sein. Eine große Anzahl der Zellen hat scheinbar rundliche Gestalt, doch dürfte es sich hierbei zumeist um Quer- oder Anschnitte an sich länglicher Formen handeln. Sonst reicht der Grad der Anfärbung von hellem Zellinnern mit eben erkennbarer Wand bis zu einheitlich dunklen Zellen, die dann meist gekrümmt sind. Neben diesen scharf konturierten Bauelementen, die von ihrem Erhaltungszustand her jung und kaum primärer Natur, sondern diffuses Sekundärwachstum aus Sporen sein dürften, kommen gleichmäßig verteilt auch solche vor, die undeutlich begrenzt und mehr oder weniger stark zerfallen sind. In ihren durchschnittlichen Maßen entsprechen sie "normalen" länglichen Zellen, z.B. einer 2 Tage alten Kolonie.

Der Aufbau dieses Teiles der Sporenschicht ist verhältnismäßig locker. Die Zellen sind, sicherlich artefiziell bedingt, im Schnitt zu kleinen Gruppen zusammengeballt, so daß ein netzartig-lückiges Gefüge entsteht.

Von einer verstärkten Versporung entlang der Schichtmitte wie bei der Entnahme nach 10 Tagen ist hier nichts zu erkennen. Lediglich in dem Bereich zwischen der im Schnitt linken und mittleren Erhebung ist dicht unter der Deckschicht ein dünner Streifen mit stärkerer Versporung vorhanden.

Den oberen Abschluß bildet die flache Deckschicht aus länglichen Zellen

von maximal 5,0 x 1,2 µ, die randwärts am stärksten anfärbbar sind und in den Konturen deutliche Reste einer strangartigen, gewellten Anordnung erkennen lassen. Sehr vereinzelt kommen hier auch Sporen vor.

Diese Schichtung durchzieht den größten Teil der Kolonie im Bereich zwischen den beiden äußeren Erhebungen. Von diesen aus nach außen gesehen verwischen sich zunehmend die beiden mittleren Schichten. Mittel- und Deckschicht vereinigen sich zu einem undeutlichen Aufbau aus rundlichen Zellen unter rascher Höhenabnahme der Kolonie, die ohne dünnen Zuwachs endet und das Wachstum weitgehend abgeschlossen haben dürfte. Was bereits bei der Deckschicht erwähnt wurde, gilt auch für alle anderen, vor allem aber die Sporenschicht: Der Aufbau ist im Koloniezentrum am stärksten gealtert, und nach außen nehmen Deutlichkeit, Stärke der Anfärbung und Schärfe der Zellkonturen zu.

5.5.1.5 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 6,5 mm Durchmesser. Oberfläche uneben, mit mehreren Sekundärkolonien von weißlicher Farbe, die teils im Kolonieinnern, teils auf der Koloniefläche zu liegen scheinen und etwa nach 22 Tagen sichtbar wurden. Sehr schmaler Zuwachsrand.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Zentrum der Kolonie durch Sekundärwuchs breit aufgewölbt und maximal 0,19 mm hoch. Schnitthälften im Umriß sehr ungleich, in schmalen, dünnen Zuwachs auslaufend. Durchmesser etwa 6,1 mm.

Wegen des beträchtlichen Durchmessers der Kolonie mit zahlreichen Abweichungen im Aufbau wurde zur Erleichterung der Beschreibung, am linken Schnittende beginnend, eine Untergliede-

rung in 5 Zonen vorgenommen.

Die Zone 1 beginnt als flacher Zuwachsrand aus kurzen und dicken Zellen von im Mittel 3,2 x 1,2 µ, die bisweilen gekrümmt sind, kurze Ketten bilden können und sich kräftig anfärben lassen. Einzelheiten einer besonderen Anordnung lassen sich nicht erkennen. Aus denselben Bauelementen wölbt sich auch der beginnende Koloniekörper stark auf, wobei die Zellen bereits vor dessen erster maximaler Erhebung basal und zur oberen Begrenzung hin Zerfallserscheinungen zeigen und zunehmend zur Mitte hin mit Sporen durchsetzt sind.

Die Zone 2 erstreckt sich über die knappe Hälfte des Koloniedurchmessers und weist einen Schichtenaufbau auf, der weitgehend dem der vorhergehenden Entnahme nach 20 Tagen entspricht. Die Basalschicht weicht hier insofern von dem jüngeren Stadium ab, als in ihr besonders randwärts zahlreiche Sporen neben wenigen dick-ovalen, oder gekrümmten, stark anfärbbaren Zellen vorkommen. Bei letzteren dürfte es sich um Sekundärwuchs aus Sporen handeln, und es zeigt sich, daß zum Zentrum der Kolonie hin die Anzahl der Sporen ab- und die der Sekundärzellen zunimmt.

In der Sporenschicht sind randwärts Sporen nur verstreut vorhanden, und zum Zentrum hin nimmt ihre Anzahl zu. Am stärksten ist die Versporung dann unter der Deckschicht, aber auch diffus verteiltes Sekundärwachstum findet sich, wie in der Basalschicht, am häufigsten zum Zentrum hin.

Mit diesem Schnitt werden in der Zone 2 noch zwei kompaktere Sekundärkolonien in der Sporenschicht erfaßt. Deren eine hat durch den Expansionsdruck ihrer Zellen die Kolonieoberfläche mit der Deckschicht vorgewölbt und an einer Stelle sogar aufgerissen. Die kräftig anfärbbaren Zellen sind von sehr unterschiedlicher Gestalt, aber zumeist dicklich-oval oder gekrümmt. Vereinzelt sind dazwischen auch noch Sporen anzutreffen. Die

zweite, im Durchmesser etwas kleinere Sekundärkolonie liegt am Ende dieser Zone mehr in der Mitte über der "komprimierten Zerfallsschicht". Dadurch ist sie stärker eingeschlossen und konnte die Oberfläche nicht aufwölben. Sie besteht aus Zellen gleicher Art wie die vorgenannte, allerdings ohne Beteiligung von Sporen, in sehr dichter Lagerung.

Die Zone 3 umfaßt das Koloniezentrum unter starker Aufwölbung und Höhenzunahme, die durch gewaltiges Sekundärwachstum bedingt sind und ähnliche Erscheinungen bei Bacillus subtitis und pumilus weit übertreffen. Dieses Sekundärwachstum nimmt den Raum der ehemaligen Sporenschicht unter zusätzlicher Höhenausdehnung ein. Im Schnittumriß ähnelt es einer typischen, freistehenden Oberflächenkolonie, die im Zentrum am erhabensten ist und nach den Seiten erst geringfügig, dann rasch an Höhe abnimmt und in einen flachen Rand ausläuft.

An die Zone 3 grenzt beidseits ein gleichartiger Schichtenaufbau, der auch in dieser selbst deutlich erkennbar ist. Deshalb und wegen der ungefähren Symmetrie der beiden Sekundärkoloniehälften liegt der Schluß nahe, daß deren Wachstum im Zentrum begonnen und sich von dort zentrifugal in die Schichtung der Primärkolonie hinein ausgebreitet hat. Letztere wurde dabei aufgespalten, komprimiert und von den Ausläufern locker durchwachsen.

Während sonst Sekundärwachstum überwiegend aus dicken, atypischen und uneinheitlichen Bauelementen besteht, überrascht der Aufbau dieser großen Sekundärkolonie aus einem Flechtwerk länglicher Zellen mit einem Durchmesser von etwa 0,7 µ, die zu Ketten und dünnen Strängen verbunden sind. Allerdings scheinen die Zellen zumeist etwas gekrümmt und damit die Stränge von leicht welligem Verlauf. Letztere sind im Zentrum ungefähr senkrecht angeordnet und von da nach außen zunehmend geneigt bis zu einem Winkel von etwa 45° am Ende der stärksten Höhenausdehnung, um dann in Bögen und Wellen sich nach oben und zurück zu

krümmen. Vereinzelt finden sich auch noch Reste primärer Zellen und Sporen in diesem sonst sehr einheitlichen Gefüge.

Aber auch die Basalschicht, die im übrigen Teil der Kolonie stark mit dicklichen oder gekrümmten Sekundärzellen durchwachsen ist, zeigt in dieser Zone, besonders in deren Mitte, verstärkten Sekundärwuchs aus länglichen Zellen und Zellketten. Dieser hat an der gesamten Aufwölbung erheblichen Anteil und steht mit der eigentlichen Sekundärkolonie bzw. deren Ausläufern durch die "komprimierte Zerfallsschicht" hindurch in Verbindung.

Im Zentrum der Zone 3 folgt auf die stark mit Sekundärwuchs durchsetzte Basalschicht eine "komprimierte Zerfallsschicht", die hier aus scheinbar 3 Teilen besteht. Bei dem untersten dürfte es sich um den primären Anteil handeln, der sehr stark zusammengedrückt ist, während der obere einen weitaus weniger dichten Aufbau aus deutlich erkennbaren Zellresten zeigt. Der mittlere Teil dagegen weist zahlreiche Sporen auf, so daß möglicherweise die beiden letzteren Reste der ehemaligen Sporenschicht darstellen, die in diesem Bereich durch die mächtige Lagerung von Sekundärzellen ersetzt wird, während andere Reste der Sporenschicht zusammen mit der Deckschicht den oberen Abschluß bilden. Dieser Aufbau erstreckt sich horizontal über den etwa gleichmäßig erhabenen zentralen Bereich der Sekundärkolonie. Darüber hinaus ist wieder die Anordnung aus Basalschicht, einer einheitlichen "komprimierten Zerfallsschicht", Sporen- und Deckschicht zu erkennen mit der Abwandlung, daß die Sporenschicht etwa in der Mediane von den nach außen hin immer geringer werdenden Ausläufern der großen Sekundärkolonie durchsetzt ist.

Die Zone 3 endet mit der bereits erwähnten Vereinigung von Sekundärkolonie und Sekundärwuchs in der Basalschicht, wobei die "komprimierte Zerfallsschicht" durchbrochen wird.

Am Anfang der Zone 4 erfolgt noch einmal eine Aufwölbung des Koloniepro-files, die durch erneute Zunahme des Sekundärwuchses in der Basal- und vor allem der Sporenschicht bedingt ist. Weiter randwärts reduziert sich der Sekundärwuchs bis auf geringe Reste in der Sporenschicht. Unter zunehmender Verringerung der Koloniehöhe enden Basal- und "komprimierte Zerfallsschicht" an der unteren Koloniebegrenzung.

Die Zone 5 zeigt einen einheitlichen Aufbau aus dicht gelagerten, zerfallenden Zellen von undeutlicher Kontur und schwacher Anfärbung. Vereinzelt sind sie noch mit atypischen, dicklichen Zellen und wenigen Sporen durchsetzt. Von der Basis gehen noch mehrere undeutlich voneinander abgesetzte kleinere Sekundärkolonien aus. Das Ende bildet ein flacher Zuwachsrand aus denselben Zellen, wie sie bei Zone 1 bereits beschrieben wurden.

5.5.2 Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar:

5.5.2.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Die Entstehung der Mikrokolonien auf diesem Substrat stimmt weitgehend mit den Gegebenheiten auf Bouillon-Pepton-Agar überein. Die Einzelzellen messen im Mittel 8,0 x 1,5 µ und bilden bei der Teilung Zellketten, die leicht in Stücke aus etwa 5 Bauelementen zerfallen. Aus diesen entstehen schon frühzeitig rundliche, einschichtige Lagen, in denen vom Zentrum her Zellen zu weiteren Schichten nach oben gedrückt werden, womit das Höhenwachstum eingeleitet ist. Mit zunehmendem Wachstum entstehen in der üblichen Weise Zellstränge, die in horizontaler und vertikaler Ebene gewunden sind.

5.5.2.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie von etwa 2,5 mm Durchmesser, mit allmählich verlaufendem, faserig-zackigen Rand. Oberfläche glatt. Opaker Normalteil weiß, während der Sektor durchscheinend ist und die kanppe Hälfte der Koloniefläche einnimmt. Breiter Amylolysehof im Substrat um die Kolonie (auf dieser und anderen Schalen befanden sich auch zahlreiche einzelstehende Normal- bzw. "Hellkolonien", von denen nur die ersteren einen Amylolysehof hervorriefen).

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Koloniedurchmesser 2,3 mm, wovon 1,3 mm auf den Normalteil links im Bild und 1,9 mm auf den Sektor entfallen. Maximale Höhe in beiden Teilen etwa 0,04 mm. Profil stark gewellt, besonders beim Sektor, wo die Erhebungen und Vertiefungen sich parallel auch an der unteren Begrenzung finden. Randpartien allmählich, gering wellig abfallend.

5.5.2.2.1 Normal-Teil

Die Randzone ist aus Zellen von im Mittel 3,5 x 1,0 µ aufgebaut, die zu Ketten und Strängen verbunden sind, welche undeutlich gewellt in horizon-

taler wie auch vertikaler Ebene liegen. Die Wellenstruktur bewirkt auch die unebene Oberfläche der Kolonie, die bald an Höhe zunimmt und von der zweiten größeren Erhebung bis zum Beginn des Sektors (und darüber hinaus) eine deutlich abgesetzte Dreischichtung zeigt. Bei keinem anderen der untersuchten Keime konnte eine derart ausgeprägte Differenzierung im Kolonieaufbau für ein so junges Stadium festgestellt werden.

Die Basalschicht besteht aus Zellen von im Mittel 3,2 x 0,8 µ, die zu Ketten und diese teilweise zu dünnen Strängen verbunden sind. Die Ketten und Stränge sind locker miteinander verflochten und zeigen in ihrem Gefüge zahlreiche Lücken verschiedenen Ausmaßes, von denen die größten artefiziell sein dürften. Durch die dreidimensionale Verflechtung besonders der Zellketten entstehen unzählige Überlagerungen, und im Schnitt werden die Zellen nur selten in ihrer gesamten Länge erfaßt, so daß trotz des lockeren Aufbaues ein in den Feinheiten nur undeutliches Bild entsteht. Die obere Begrenzung dieser Schicht, und damit auch die untere der Mittelschicht, verlaufen uneben wellig ineinander. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Andeutungen eines welligen Verlaufes der Zellstränge in horizontaler Ebene, da undeutliche Längs- und Querschnitte von Strängen zu erkennen sind.

Die geringste Höhenausdehnung hat die Mittelschicht, deren Bauelemente deutlich von denen der Basalschicht unterschieden sind. Es handelt sich um einheitliche runde bis ovale Zellen mit einem Durchmesser von im Mittel 1,2 µ, die dicht aneinander gelagert und mit blasigen, unregelmäßigen Lücken durchsetzt sind. Zur Deckschicht hin finden sich ganz vereinzelt Sporen, aber weitere Differenzierungen oder Strukturen lassen sich nicht erkennen.

Die stark versporte Deckschicht besteht neben Sporen von 1,4 x 0,8 µ aus ähnlichen Bauelementen wie die darunterliegende Schicht. Aber

diese sind, weil vermutlich bereits im Zerfall befindlich, nur undeutlich zu erkennen und besonders nach der oberen Koloniebegrenzung zu sehr dicht gelagert. In dieser Schicht finden sich noch Andeutungen einer Wellenstruktur.

5.5.2.2.2 "Hell"-Sektor

Dieser Teil der Kolonie beginnt mit einer merklichen Höhenzunahme gegenüber dem vorgenannten, dem er im Aufbau bis auf die praktisch fehlende Versporung der Deckschicht sehr ähnelt. Pro Schnitt sind nur wenige Sporen zu finden. Da die Sporen für diese Form kleiner sind als die vegetativen Zellen, aus denen sie hervorgehen, dürfte der Volumenunterschied die geringe, wenn auch erkennbare, Höhendifferenz zwischen dem versporten und dem kaum versporten Kolonieteil bedingen.

Der auffällige makroskopische Unterschied zwischen dem hell durchscheinend wirkenden Sektor und dem normalen opakweißen Kolonieteil dürfte auf dem Fehlen der Sporen mit höherem Brechungsvermögen als die vegetativen Zellen beruhen. Diese Erscheinung, die auch in Form einzelner Kolonien vorkommt, soll als "Hell"-Variante oder "Hell"-Sektor bzw. -Kolonie bezeichnet werden.

Stärker als im Normalteil verlaufen im Sektor die scheinbar umfangreicheren, sich aber auf jeden Fall deutlicher abhebenden Zellstränge in kräftigen Wellenzügen, die auch für die unebene Oberfläche verantwortlich sind. Die Schichtung endet etwa mit dem Beginn des letzten Durchmesserdrittels zum Rande hin, das den gleichen Aufbau und Verlauf wie der Normalteil aufweist.

5.5.2.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Unregelmäßig ausgebreitete Kolonie von

etwa ovaler Form und 10,0 mm Durchmesser, die an einer Seite mit der Nachbarkolonie zusammenstößt und diese geringfügig umwächst. Der opake, weiße Normalteil mit glatter Oberfläche nimmt sektorenartig nur etwa 1/4 der Koloniefläche ein und die übrigen etwa 3/4 bedeckt der durchscheinende Teil der Hell-Variante mit welliger bis gewulsteter Oberflächengestaltung.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Durchmesser etwa 8,6 mm, wobei 4,2 mm auf den Normal- und 5,4 mm auf den Hellteil entfallen. Beide Kolonieteile von ähnlichen Umrissen sind durch starke Höhenabnahme voneinander abgesetzt. Profil jeweils langsam vom Zentrum mit maximalen Höhen von 0,1 mm (Normalteil) bzw. 0,11 mm abfallend und Auslauf in dünnen Zuwachs.

5.5.2.3.1 Normal-Sektor

Der dünne Zuwachsrand zeigt keine Versporung und besteht aus rundlichen bis ovalen, stark gealterten Zellen, die auch Kettenbildung erkennen lassen und nur schwach anfärbbar sind. Vereinzelt kommen auch atypische Zellen von birnenförmiger Gestalt vor. Mit beginnender Höhenzunahme setzt eine starke Versporung ein, die zwischen oberer und unterer Begrenzung den gesamten Teil der Kolonie durchzieht. Die Sporen messen 1,6 x 0,8 µ und färben sich sehr unterschiedlich stark an. Die Kolonie ist aus einem gleichmäßigen Netzwerk von Sporen, zerfallenen Zellen und Schleim aufgebaut, das mit artefiziellen Lücken durchsetzt ist. Es sind keine Andeutungen einer ehemaligen Schichtung zu erkennen. Lediglich ist die Struktur im Bereich der ehemaligen Deckschicht dichter, und dort finden sich auch die meisten stärker angefärbten Sporen.

5.5.2.3.2 Hell-Teil

Die Versporung geht im Schnitt mit einem schmalen Band von etwa 0,4 mm Länge im basalen Bereich, rasch an Menge abnehmend, auch auf diesen Teil der Kolonie über. Sonst sind, wie bei der Entnahme nach 2 Tagen, auch hier nur ganz vereinzelt Sporen zu finden. Der ehe-

malige Aufbau aus 3 Schichten ist im Koloniekörper noch andeutungsweise zu erkennen. Am dichtesten liegen die Zellen bzw. Zellreste im basalen Bereich. In der mittleren, relativ locker aufgebauten Schicht sind noch wellige Zellstränge vorhanden. Die Zellen haben meist längliche (im Mittel 3,2 x 0,8 µ) oder rundliche Gestalt mit einem Durchmesser von im Mittel 2,0 µ. Sie sind stark gealtert und unterschiedlich angefärbt. Auch die einzelnen Zellen, besonders die stärker angefärbten, sehen in sich zumeist undeutlich scheckig-granuliert aus. Das Ende des Kolonieteiles läuft aus in einen dünnen Zuwachsrand aus rundlichen bis ovalen Zellen von starker Anfärbung, die dicht gelagert sind.

5.5.2.4 Die Entnahme nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur ähnelte der vorgenannten weitgehend, so daß sich eine gesonderte Darstellung erübrigt. Lediglich die Alterung der Zellen hat gegenüber jener zugenommen und die Reste der Koloniestrukturen sind dementsprechend noch undeutlicher geworden. Sekundärwachstum war nicht festzustellen.

5.6. Bacillus mycoides

5.6.1 Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar:

5.6.1.1 Wachstum bei Zimmertemperatur

5.6.1.1.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung.

Die jüngsten Koloniestadien ähneln sehr denen der Rauhform von Bacillus cereus, als dessen Varietät Bacillus mycoides auch angesehen wird (z.B. SMITH et al. 1952). Die Einzelzellen sind groß und messen im Mittel 8,0 x 1,9 µ. Bacillus mycoides unterscheidet sich unter den genannten Bedingungen insofern von den übrigen untersuchten Species, als besonders starre Zellketten von vergleichsweise erheblicher Länge gebildet werden, die schwer auseinanderbrechen. Sie zeigen eine aus-

geprägt zentrifugale Wachstumsrichtung, so daß die jungen Mikrokolonien aus einer unregelmäßigen, etwa sternförmig-strahligen Anordnung vom Zentrum der Kolonie nach außen strebender langer Zellketten bestehen.

Bereits in diesem Stadium ist die für den Stamm charakteristische rechtswendige Krümmung der meisten Zellketten deutlich zu erkennen, die im Makrokoloniestadium auch dem unbewaffneten Auge sichtbar wird. In keiner der untersuchten Kolonien schließen sich allerdings Rechts- bzw. Linkswendigkeit alternativ aus, sondern kommen nebeneinander vor, Zellketten wechseln sogar während des Wachstums ihre Krümmungsrichtung oder verlaufen völlig regellos. Trotzdem dominiert stets diejenige Krümmungsrichtung, welche die später auch makroskopische Zuordnung zu einem der beiden Charakteristika, hier Rechtswendigkeit, ermöglicht.

Das weitere Koloniewachstum vollzieht sich derart, daß entstehende freie Enden von Zellketten, meist infolge Schleifenbildung und starker Krümmung durch Zerbrechen, an benachbarten Zellketten entlanggleiten und deren Verlauf über mehr oder weniger weite Entfernung folgen. Überkreuzungen sind anfangs selten und treten vor allem bei älteren Stadien mit starken Zellsträngen auf. Aus einer Zellkette oder wenigen entstehen auf diese Weise zunehmend dicker werdende Zellstränge, indem sich vom Koloniezentrum nach außen strebende Ketten aneinanderlegen. Die bereits vorhandenen Zellketten bzw. -stränge üben also für neu hinzukommende eine Art "Gerüst"- oder "Schienen"-Funktion aus unter Beibehaltung der vorgegebenen Krümmungsrichtung.

Im Gegensatz zu der Entwicklung der Mikrokolonien, wie sie für die meisten anderen Bacillus-Species üblich ist, bleiben bei Bacillus mycoides unter diesen Bedingungen stets lockere, strahlig-strangartige Kolonien mit ausgeprägt zentrifugaler Ausbreitungstendenz erhalten. Dabei erfolgt nur ein verhältnismäßig geringes Wachstum in die Höhe, das vom Kolo-

niezentrum ausgeht, indem der Durchmesser der Zellstränge allmählich durch hinzukommende Zellketten größer wird und zum anderen die Kolonieform im Zentrum durch Ausfüllen des Raumes zwischen den Hauptsträngen eine gewisse Abrundung erfährt. Aber das Höhenwachstum erreicht nie eine solche Ausdehnung und Quantität, daß dadurch die charakteristische Gestalt der Kolonien undeutlich würde.

Es war zu erkennen, daß für zahlreiche Kolonien des verwendeten Stammes von Bacillus mycoides die Krümmung der Zellketten bedingt ist durch

a) eine unterschiedlich starke Krümmung der Zellen selbst, die nach links oder rechts erfolgen kann, und
b) ein meist nur geringfügiges Abknicken der Einzelzellen einer Zellkette von der theoretisch linearen Anordnung jeweils an den Stellen, wo diese nach der Teilung an den Querwänden miteinander verbunden bleiben.

Beide unter a) und b) angeführten Ursachen können innerhalb einer Zellkette nacheinander und je nach deren Länge und der Anzahl der Einzelzellen wenig bis vielfach auftreten. Es ist deutlich zu erkennen, daß trotz auch nach links gekrümmter bzw. abgeknickter Zellen insgesamt ein rechtswendiger Verlauf der Zellketten resultieren kann.

5.6.1.1.2 Makrokolonie aus Punktbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 2 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rauhe, lockige Kolonie aus überwiegend rechtswendigen Strängen. Durchmesser etwa 5,4 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Koloniaufbau aus abwechselnd erhabenen und flacheren Teilen mit einer maximalen Höhe von 0,035 mm, die angeschnittenen Zellsträngen entsprechen, zwischen denen randwärts teilweise die Verbindung fehlt. Unter den erhabenen Teilen starkes Tiefenwachstum von maximal 0,16 mm. Koloniedurchmesser 5,04 mm.

Die auch im Schnitt meist in der Verbindung zu Ketten erkennbaren Einzelzellen differieren in diesem Stadium mit einer Größe von im Mittel 3,5 x 1,0 µ beträchtlich von denen der Mikrokolonien auch unter der Berücksichtigung, daß es sich bei ersteren um fixiertes Material handelt. Die Zellketten sind dicht ineinander verflochten, aber ein besonderes Aufbauprinzip ist nicht zu erkennen. Im Zentrum sind vor allem schräge Anschnitte und nach außen mehr Längsschnitte von Zellsträngen getroffen. Eine beginnende Versporung ist nicht angedeutet.

Von den erhabeneren Kolonieteilen geht lockeres Tiefenwachstum aus, dessen Beginn bisweilen nur undeutlich vom Oberflächenwachstum zu trennen ist.

5.6.1.1.3 Makrokolonie aus Punktbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 10 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Unbedeutende quantitative Veränderungen gegenüber der vorigen Entnahme. Durchmesser etwa 7,0 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Wechsel von erhabenen und flachen Kolonieteilen mit maximal 0,035 mm Höhe. Am äußersten Rand teilweise geringe fehlende Verbindung zwischen den einzelnen Zellsträngen. Durchmesser 6,5 mm. Sehr starkes Tiefenwachstum von maximal 3,5 mm, das an Flächenausdehnung das Oberflächenwachstum weit übertrifft.

Dem flachen Kolonieaufbau fehlen auch in diesem Stadium jegliche erkennbaren Differenzierungen. Es ist über die gesamte Kolonie starke Versporung eingetreten mit einer Häufung in der oberen Hälfte. Die Sporen messen 1,6 x 0,8 µ und liegen in den Zellen von im Mittel 3,0 x 1,0 µ etwas dezentriert. Im zentralen Teil der Kolonie sind an den basalen Zellen bereits deutliche Alterungserscheinungen festzustellen, während die jüngeren Randteile besser erhalten sind.

Besonders zerfallen ist das ebenfalls locker versporte Tiefenwachstum in seinem oberen und ältesten Bereich. Weiter im Substrat sind die Zellen besser erhalten und in den äußersten Teilen bei rundlicher Gestalt besonders dicht gelagert.

Nach diesen Befunden ergeben sich für Bacillus mycoides auf Bouillon-Pepton-Agar hinsichtlich der Feinstruktur der Kolonien nur Aussagen von geringem Wert.

5.6.1.1.4 Die Entnahme nach 30 Tagen ist erwartungsgemäß in der Alterung weiter fortgeschritten, aber die Strukturen sind immer noch relativ gut erhalten. Im äußeren Teil des Tiefenwachstums finden sich einzelne kompakte Zellaggregationen von ovalem bis linsenförmigem Querschnitt, die in Gestalt und Struktur Tiefenkolonien gleichen. Diese Gebilde sind versport und erheblich gealtert.

Sonst gleicht diese Entnahme der vorgenannten weitgehend, daß sich eine ausführlichere Darstellung erübrigt.

5.6.1.2 Wachstum bei + 37° C

5.6.1.2.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung.

Die jüngsten Mikrokoloniestadien beginnen, wie jene unter Zimmertemperatur, als mehr oder weniger linear ausgerichtete Zellketten von wenigen Bauelementen. Mit zunehmender Länge treten aber in deren Verlauf rasch Unregelmäßigkeiten auf, indem sie am Zusammenstoß zweier Zellen abknicken oder einzelne Zellen selbst mehr oder weniger stark gekrümmt, gewellt oder geknickt sind. Die meisten Zellketten erreichen auch hier beträchtliche Längenausdehnung, aber es

fehlt ihnen die Starrheit und der lineare bis leicht gekrümmte Verlauf, die erst zu ausgesprochen flachen typischen Bacillus mycoides-Kolonien großer Flächenausdehnung führen.

Die Zellen sind oft nur undeutlich voneinander abgegrenzt und messen im Mittel 8,0 x 1,0 µ.

Durch den unregelmäßigen gekrümmten Verlauf wachsen schon frühzeitig Zellketten über- und untereinander und erreichen so ein deutliches Höhenwachstum, wobei sie sich zunehmend ineinander verschlingen. Wie unter Normalbedingungen bei Zimmertemperatur wachsen auch hier Zellketten parallel zueinander. Aber dies führt nicht zu einem etwa sternförmig sich ausbreitendem "skelettartigen" Gerüst, das der Kolonie eine charakteristische makroskopisch erkennbare Gestalt verleiht, weil immer wieder unregelmäßig gestaltete Zellen und die fehlende Starrheit der Ketten eine ausgeprägt zentrifugale Ausbreitung behindern und an deren Stelle wellige Auffaltungen und Überlappungen treten. So entstehen rundliche Mikrokolonien ohne größere Zwischenräume mit geringerem Flächen- und dafür stärkerem Höhenwachstum, in denen dicke Zellstränge von welligem Verlauf in zuerst überwiegend horizontaler Ebene unter starker Verschlingung dominieren. Mit zunehmender Koloniegröße wird deren Ausrichtung in vertikaler Ebene deutlicher, die dann vor allem auch in dem folgenden Makrokoloniestadium in Erscheinung tritt.

5.6.1.2.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 2 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie mit dichtem, erhabenem Zentrum und einem scharf abgesetzten, flacheren und durchscheinenden Rand, der unregelmäßig breit und gering gezackt ist. Durchmesser etwa 4,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x) : Kolo-

niezentrum maximal 0,06 mm hoch. Von dort zum Rande geringfügig im Profil ansteigend auf 0,07 mm und danach flach auslaufend. Sehr lockeres und unregelmäßiges Tiefenwachstum bis nahe unter die Randregion, maximal 0,18 mm in das Substrat.

Die Kolonie zeigt eine sehr einheitliche Struktur aus länglichen Bauelementen, die zu locker räumlich miteinander verflochtenen Ketten verbunden sind. Die Einzelzellen wechseln erheblich in Form und Größe, die im Mittel 5,0 x 0,8 µ beträgt. Häufig kommen länglich-keulige Formen vor. Die meisten Zellen sind mehr oder weniger gekrümmt, was Verschlingung der Zellketten ineinander bewirkt, die in der Koloniemitte und an deren Enden etwa senkrecht verlaufen. Durch Vakuolen in den Zellen und die räumliche Verflechtung sind die einzelnen Bauelemente nicht immer deutlich voneinander abgegrenzt zu erkennen, und im Schnitt entsteht ein undeutliches, weil weitgehend dreidimensionales, Bild.

Dieser Kolonie fehlt ein geschichteter Aufbau ebenso wie jede Andeutung einer beginnenden Versporung. Lediglich eine gewisse Verdichtung der Basis ist zu erkennen.

5.6.1.2.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 12 Tagen bei + 37° C im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie mit zwei konzentrisch-ringförmigen Vertiefungen und sehr schmalem Zuwachs. Durchmesser etwa 4,9 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Entsprechend dem makroskopischen Bild, mit 5 flachen hügeligen Erhebungen, von denen die beiden auf die zentrale folgenden mit 0,09 mm die höchsten sind. Sehr starkes Tiefenwachstum von maximal 0,3 mm in das Substrat vor allem unter dem Zentrum des Oberflächenwachstums.

Trotz starker Ablösung der Kolonie vom Substrat ist diese, ebenso wie des Tiefenwachstums, in sich sehr gut erhalten geblieben. Die beiden Koloniehälften im Schnitt sind dem Umriß nach etwa symmetrisch und gleichen sich auch weitgehend im zellulären Aufbau, der im Prinzip der Entnahme nach 2 Tagen ähnelt. Durch die bereits deutliche Alterung ist die Struktur vor allem im Zentrum als dem ältesten Teil der Kolonie undeutlich geworden. Die meist gekrümmten Zellen sind wieder in Form von Ketten stark miteinander verflochten. Während sie im Zentrum in der Größe denen der vorgenannten Entnahme gleichen, werden sie nach dem Rande hin zunehmend schlanker und färben sich weniger stark an. Nach dort nehmen aber auch unregelmäßig gestaltete dicke bis rundliche Zellen zu.

Der Koloniekörper weist basal wieder eine dichtere Lagerung der Zellen auf, ohne daß es sich dabei um eine eigentliche Schichtung handelt. Dieser Teil ist auch, vor allem in der unteren Hälfte, stark versport. Die Versporung reicht in der linken Schnitthälfte nur bis hinter das Ende der zentralen Erhebung, dagegen in der rechten randwärts bis zum Beginn des flachen Zuwachses. Im Mittel messen die Sporen 1,6 x 0,8 µ und entsprechen damit solchen aus Kolonien, die bei Zimmertemperatur gewachsen sind.

Das Tiefenwachstum erstreckt sich unter der Oberflächenkolonie im Bereich zwischen den drei mittleren Erhebungen. Ein Ausschnitt im Koloniezentrum trifft dabei auf zwei fast voneinander getrennte Lagen, zwischen denen sich nur wenige verstreute Zellen finden. Die obere und zugleich ältere von beiden ist zur Kolonie hin stark versport und bereits deutlich gealtert. Im unteren Teil sind die Zellen stärker angefärbt, meist von fast kokkoider Gestalt und zu Ketten verbunden. In der zweiten, unteren Lage überwiegen wieder dünnere und längliche Bauelemente, die oft gekrümmt sind, während rundliche Zellen und Sporen nur vereinzelt vorkommen. Die beiden Lagen vereinigen sich

weiter nach außen, wo das Tiefenwachstum in Form von dichten, kugelig-klumpigen Zellaggregaten, die nur zur Oberflächenkolonie hin gering versport sind, langsam ausläuft.

5.6.1.2.4 Die Entnahme im Alter von 30 Tagen ähnelt der vorgenannten, so daß sich eine gesonderte Darstellung erübrigt. Infolge starker Alterung der Zellen ist der Kolonieumriß flacher geworden, und im Tiefenwachstum sind die atypischen Zellen weitgehend zerfallen. Die Quantität der Versporung hat nicht zugenommen.

5.6.2 Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar:

5.6.2.1 Wachstum bei Zimmertemperatur

5.6.2.1.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung, Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung.

Die Entwicklung dieser Mikrokolonien vollzieht sich im Prinzip gleichartig der auf Bouillon-Pepton-Agar. Lediglich die Einzelzellen sind im Mittel etwas kleiner als auf BPA und messen 6,5 x 1,6 µ. Übereinstimmend mit PRINGSHEIM u. LANGER (1924) tritt die strangartig-spiralige Koloniestruktur auf diesem Mangelnährboden deutlicher hervor als auf nährstoffreicheren Substraten. Auch die Anzahl der Stränge, die linkswendig oder ohne bestimmte Ausrichtung verlaufen, ist weitaus geringer und die Rechtswendigkeit ausgeprägter als auf BPA.

An ihren Enden verlaufen die Hauptstränge zumeist stärker gekrümmt als an der Basis, so daß mit zunehmendem Alter eine verstärkte Krümmungstendenz anzunehmen ist. Bisweilen wechseln die äußersten Enden betont rechtswendiger Zellstränge ihre Krümmungsrichtung. An den Hauptsträngen fielen außerdem sehr stark und bisweilen fast kreisförmig gekrümmte kleine Ausläufer auf, deren Krümmungsverlauf rechts- wie linkswendig sein kann.

Für die Krümmung der Zellketten und Zellstränge konnten die gleichen Ursachen festgestellt werden, die unter 5.6.1.1.1 für Mikrokolonien auf Bouillon-Pepton-Agar beschrieben wurden. Nur sind auf Weizengrießagar die Krümmungen der Einzelzellen und die Abknickungen innerhalb von Zellketten stärker ausgeprägt. Am stärksten gekrümmt erscheinen die Zellen der erwähnten Ausläufer an den Hauptsträngen. Diese Eigentümlichkeiten erklären die insgesamt deutlichere Krümmung der Zellketten und -stränge in den Mikro- und Makrokolonien auf Mangelnährboden.

5.6.2.1.2 Makrokolonie aus Punktbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Lockerer und lockiger Aufbau aus stark rechtswendig verlaufenden, nach außen allmählich dünner werdenden weißlichen Zellsträngen. Koloniedurchmesser etwa 5,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125fach): Kein zusammenhängender Schnitt, sondern mehrere flache, hügelige Kolonieteile mit einer maximalen Höhe von 0,02 mm, die nicht immer miteinander in Verbindung stehen. Durchmesser 5,2 mm. Unter dem größten Teil der Kolonie lockeres Tiefenwachstum von maximal 0,024 mm.

Noch ausgeprägter als auf Bouillon-Pepton-Agar zeigt das Schnittbild dieser Kolonie mehrere hügelige Stranganschnitte, die untereinander nur teilweise durch dünne Lagen von einer bis zu wenigen Zellen hoch verbunden sind. Die Einzelzellen messen im Mittel 4,0 x 1,4 µ und sind damit wieder deutlich kürzer als in den Mikrokolonien. Die flacheren Kolonieteile bestehen vor allem aus längs angeschnittenen Zellsträngen, in denen die Zellen zu langen Ketten verbunden erkennbar sind, während sie in den erhabeneren Teilen meist als Querschnitte erscheinen. Die Ursache hierfür liegt in dem stark gekrümmten Verlauf der Stränge. So werden bei beliebigen Schnitten durch das Koloniezentrum insgesamt mehr Stränge etwa quer und damit in ihrer jeweils gesamten Höhenausdehnung getroffen als Stränge in genau medianen Längsschnitten, die erforderlich wären, um für diese die maximale Höhe im Schnittbild zu

zeigen.

Oft bestehen aber vor allem die erhabeneren Kolonieteile nicht nur aus quer, sondern auch aus längs angeschnittenen Zellen, welches auf einen mehr oder weniger welligen Verlauf der Zellketten in horizontaler Ebene schließen läßt. Dieser ist umgekehrt aber auch in vertikaler Ebene erkennbar. Überhaupt verläuft die untere Koloniebegrenzung nicht eben auf dem Substrat, sondern ist mehr oder weniger unregelmäßig gewellt in dieses eingesenkt.

In Schnitten, die nur mit Viktoriablau angefärbt wurden, erscheinen die Zellen im Lumen einheitlich einfarbig und sind nur in ihrer äußeren Begrenzung, vermutlich durch Schrumpfung, geringfügig eingedrückt. Stärker wird dies mit der Sporenfärbung nach KLEIN sichtbar, wo alle Zellen durch Schrumpfung vergleichsweise im Volumen kleiner sind und vielfach im zentralen Koloniebereich einen dezentriert liegenden rötlichen Einschluß erkennen lassen, der die Zelle etwas aufbläht. Hierbei handelt es sich vermutlich um bereits frühzeitig beginnende Versporung, die eindeutig auch an Präparaten von Koloniematerial derselben Schale festgestellt werden konnte.

Vom größten Teil des Oberflächenwachstums geht in das Substrat lockeres Tiefenwachstum aus, das hier relativ deutlich abgesetzt ist. Es besteht aus den gleichen Bauelementen wie ersteres und zeigt an mehreren Stellen in der Schnittebene liegende Zellketten von unregelmäßigem Verlauf sowie beginnende Versporung im oberen Bereich.

5.6.2.1.3 Makrokolonie aus Punktbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Wie Entnahme nach 2 Tagen, Stränge etwas weniger scharf konturiert. Durchmesser etwa 4,8 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x):
Ähnlich der Entnahme nach 2 Tagen. Maximale Höhe 0,03 mm, Durchmesser 4,3 mm und Tiefenwachstum maximal 0,25 mm.

Das Profil der Kolonie und deren Aufbau ähneln sehr der vorangegangenen Entnahme. Geringfügig haben gegenüber dieser die maximale Höhe sowie die Dichte des Tiefenwachstums in dessen äußerem Bereich zugenommen.

Ein gänzlich anderes Bild bietet dagegen der zelluläre Aufbau aus verschiedenartigen Bauelementen in meist dichter Anordnung ohne eine erkennbare Ausrichtung in Form längerer Zellketten wie bei der vorangehenden Entnahme. Grundsätzlich zeigt dieses Stadium bereits sehr starke Alterung und Zerfall zahlreicher Zellen. Dies bedingt einen abnehmenden Zusammenhalt, so daß zwischen Stellen dichter Zellenlagerung auch artefizielle unregelmäßig-blasige Lücken vorkommen, wie sie bereits verschiedentlich in alternden und vor allem Kolonien mit Schleimeinlagerung beobachtet wurden.

Lockere Versporung durchzieht die gesamte Kolonie ohne eine besondere Lokalisation bis in die äußersten Ausläufer, nimmt aber vom Zentrum her nach außen hin quantitativ ab und kann dort in einzelnen Teilen auch völlig fehlen. Die Sporen messen 1,6 x 0,7 µ und sind zumeist von deutlichen Resten der Sporenmutterzelle, mit im Mittel 3,2 x 1,6 µ erheblich größer, umgeben.

Im übrigen Kolonieaufbau sind neben zahlreichem zerfallenem und undeutlich erkennbarem Material die folgenden 2 Zellformen atypischer Art dominierend:

a) Dicke Zellen mit dünner, aber stark anfärbbarer Wand und schwach anfärbbarem Lumen, die in ihrer Größe stark differieren, aber im Mittel 5,0 x 2,0 µ messen und bisweilen zu kurzen Ketten im Schnitt erscheinen.

b) Meist etwas schlankere Zellen als unter a) von im Mittel 4,5 x 1,5 µ

und in ihren Maßen ebenfalls sehr differierend. Nach der Sporenfärbung sind sie kräftig dunkelblau und können länglich-gerade, keulig oder unregelmäßig gekrümmt bis zur Hufeisenform sein. In ihrem Lumen besitzen sie meist mehrere nach der Sporenfärbung dunkelrote Einschlüsse von verschiedener Größe, die nicht immer eindeutig von Sporen zu unterscheiden sind. Am deutlichsten im Umriß sind diese Zellen in den äußeren und damit jüngeren Koloniegionen zu erkennen, wo sie auch zu kurzen Ketten verbunden sein können.

Das nur in seinen äußeren Teilen dichtere Tiefenwachstum besteht aus denselben Bauelementen wie das Oberflächenwachstum und ist reichlich versport, aber insgesamt stärker zerfallen als dieses.

5.6.2.1.4 Makrokolonie aus Punktbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 30 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Wie Entnahme nach 10 Tagen. Durchmesser etwa 5,0 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Wie Entnahme nach 10 Tagen. Maximale Höhe 0,026 mm, Durchmesser 4,6 mm und Tiefenwachstum maximal 0,03 mm.

Gegenüber der vorherigen Entnahme ist die Alterung weiter fortgeschritten, und die Kolonie scheint in ihrem zellulären Aufbau bis nach den jüngeren Außenregionen weitgehend zerfallen und verdichtet zu sein. Am lockersten ist der basale Teil, der unregelmäßig in das Substrat hineinragt und zahlreiche artefizielle Lücken aufweist.

Die Kolonie wird bis in die äußersten Ausläufer von starker Versporung durchzogen, ohne dabei quantitative Unterschiede erkennen zu lassen. Die Sporen scheinen in der Größe teilweise zu differieren, messen aber in verschiedenen deutlichen Längsschnitten wie bei der Entnahme nach

10 Tagen 1,6 x 0,7 µ.

Das Tiefenwachstum ist ebenfalls durchweg stark zerfallen und zahlreich mit Sporen durchsetzt, die häufig noch von den Resten der Sporenmutterzelle umgeben sind.

5.6.2.2 Wachstum bei + 37° C

5.6.2.2.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 15 Stunden nach Beimpfung.

Die Entstehung der Mikrokolonien auf Weizengrießagar ähnelt weitgehend den bereits beschriebenen Gegebenheiten auf Bouillon-Pepton-Agar. Allerdings tritt hier noch stärker das Moment der Unregelmäßigkeit bezüglich Form und Durchmesser der Zellen sowie Verlauf der Zellketten in Erscheinung.

Mehr als auf Bouillon-Pepton-Agar scheinen die einzelnen Zellen von etwa gleicher Größe wie dort aneinander zu haften, da außer bei sehr jungen Stadien kaum freie Enden von Ketten zu erkennen sind. Frühzeitig setzt das Höhenwachstum ein, und es werden zunehmend parallel in Wellen und Faltungen verlaufende Zellketten und -stränge, anfangs in horizontaler und später zunehmend in vertikaler Ebene, für den Aufbau dieser Mikrokolonien bestimmend.

5.6.2.2.2 Makrokolonie aus Punktbeimpfung nach 2 Tagen im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundlich-ovale, weiße Kolonie mit dichtem Zentrum und faserigem Rand. Durchmesser etwa 12,1 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125fach): Höhe des Zentrums 0,09 mm. Von dort im Schnitt nach links und rechts geringe

Zunahme an Höhe auf etwa 0,1 mm und dann wieder zum Rande hin allmählicher Abfall bis zu breitem, sehr flachem Zuwachs. Gleichmäßig dichter Aufbau mit deutlicher Schichtung. Durchmesser 11,8 mm.

Für das Alter der Kolonie weist diese wohl als Folge der Forcierung des Wachstums durch die erhöhte Bebrütungstemperatur bereits eine erhebliche Flächenausdehnung nebst fortgeschrittener Differenzierung auf. Das Zentrum besteht aus drei deutlich voneinander abgesetzten Schichten, von denen jede etwa 1/3 der Gesamthöhe einnimmt.

Die Basalschicht ist dicht strukturiert und trotzdem nur relativ schwach anzufärben. Neben Schleim und Zerfallsprodukten kommen in der Mehrzahl nur in ihrer Wand anfärbbare Zellen vor, die im Mittel 4,0 x 1,0 µ messen und im Lumen leer erscheinen. Daneben befinden sich auch einzelne stärker gefärbte Zellen, die mit ersteren in einem Kettenverband liegen können. Aufgelockert wird der Aufbau durch kleinere Schrumpfungslücken.

Deutlicher strukturiert durch Zellstränge, die in vertikaler Ebene gewellt bis gefaltet liegen, ist die Mittelschicht. Die Mehrzahl ihrer Bauelemente ist stärker, aber meist nur ungleichmäßig stark anzufärben und im Umriß undeutlich. Die Zellen messen im Mittel 4,0 x 1,4 µ und sind von länglich-stäbchenförmiger bis zu spindelförmiger Gestalt oder gekrümmt. Es können auch länglich- birnenförmige Riesenzellen vorkommen, die bis zu 8,0 x 2,4 µ messen. In dieser Schicht liegen die meisten Sporen von etwa 1,6 x 0,7 µ in sporadischer Verteilung.

Vereinzelt kommen Sporen auch in der undeutlich abgesetzten Deckschicht vor, die im Grad der Anfärbbarkeit zwischen den beiden anderen Schichten liegt. Die Bauelemente scheinen überwiegend stark in Zerfall begriffen und sind in ihren Umrissen nur noch ungenau zu erkennen.

Kurz vor Beginn der Höhenabnahme in Richtung auf die Randregion hin

enden Basal- und Deckschicht. Nur die ehemalige Mittelschicht mit ihrem Aufbau aus Zellsträngen allein erfüllt dann den Raum zwischen oberer und unterer Koloniebegrenzung, wobei deren Wellungen zum Rande hin immer weniger steil verlaufen. Die Bauelemente werden dabei in ihrem Durchmesser geringer und sind vakuolisiert, während der Grad der Anfärbbarkeit zunimmt. Im Bereich des äußersten Zuwachses messen die Zellen im Mittel 3,5 x 0,8 µ.

5.6.2.2.3 Makrokolonie aus Punktbeimpfung von Sporenaufschwemmung nach 12 Tagen bei + 37° C im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Mit der Umgebung völlig konfluierte Kolonie von glasigem Aussehen mit weißlichem Zentrum, das mehrere weiße, vorgewölbte Sekundärkolonien trägt. Durchmesser etwa 8,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Höchste Erhebung der Kolonie mit angeschnittener Sekundärkolonie 0,08 mm, im Schnitt links des Zentrums befindlich. Profil allmählich zum Rande hin abfallend und in breiten, flachen Zuwachs auslaufend. Durchmesser 7,9 mm.

Zeigten sich bereits bei der Entnahme nach 2 Tagen beginnende Alterungserscheinungen im Kolonieaufbau, so hat dieser Prozeß inzwischen zu einem weitgehenden Zerfall der zusammenhängenden zellulären Strukturen geführt. In einer Grundsubstanz aus Schleim und zerfallenen Zellen mit nur kleinen und unbedeutenden Schrumpfungslücken sind atypische und zumeist undeutlich erkennbare, schwach angefärbte Zellen eingebettet. Am häufigsten treten im Koloniekörper blasig-rundliche Zellen auf, die in ihrem Lumen leer erscheinen und deren Wand nur dünn und schwer anfärbbar ist. Ihr Durchmesser beträgt im Mittel 1,7 µ. Hierbei ist nicht immer klar zu entscheiden, ob rundliche Zellen oder nur Quer- bzw. Anschnitte länglicher vorliegen. Da aber erstere in diesem Bereich stark dominieren, dürfte es sich in der Mehrzahl wirklich um rundliche oder kokkoide atypische Zellen handeln. Teilweise tragen diese auch ein dunkles Granum (Färbung nach KLEIN) in ihrem Innern. Die entsprechen-

den länglichen Zellen messen im Mittel 3,2 x 1,7 µ.

Etwa die gleichen Maße haben Zellen, die sich im Gegensatz zu ersteren kräftig dunkelblau anfärben lassen und gehäuft nahe Basis und Decke der Kolonie vorkommen. Sie sind zumeist mehr oder weniger undeutlich in den Konturen und scheinen bisweilen ungleichmäßig geschrumpft.

Überwiegend aus stärker anfärbbaren Zellen besteht die breite Sekundärkolonie. Sie ist geringfügig in die Oberfläche der Primärkolonie eingesenkt und läßt andeutungsweise im Zentrum Längs- und an den Rändern Querschnitte von scheinbar länglichen Zellen erkennen. Neben einigen "leeren" und nur in der Wand schwach anfärbbaren Zellen kommen auch vereinzelt Sporen vor.

Von der Basis des Sekundärkoloniezentrums ragen in "zapfenartiger" Anordnung zerfallene Zellen in die Primärkolonie. Sie deuten vermutlich den Bereich an, von dem die Sekundärkolonie ihren Ausgang genommen und sich nach oben ausgebreitet hat.

In der Primärkolonie selbst beginnt die Versporung im Bereich der Sekundärkolonie und zieht sich bis zum Ende des Koloniekörpers in der rechten Schnitthälfte hin. Die Sporen sind im allgemeinen sehr verstreut angeordnet.

Randwärts nimmt der starke Zerfall der Koloniestruktur ab, und es überwiegen dann längliche und schwach anfärbbare Zellen neben solchen von im Mittel 5,6 x 1,2 µ und stärkerer Anfärbung. Diese sind oft in Ketten zu mehreren verbunden und damit im Längsschnitt getroffen, so daß auf eine weitgehend zentrifugale Ausrichtung zu schließen ist.

5.6.2.2.4 Nach 30 Tagen sind makroskopisch wie mikroskopisch keine Andeutungen ehemaliger Sekundärkolonien mehr zu erkennen. Der Aufbau der Kolonie im Schnitt ähnelt bei weiter forgeschrittener Alterung

unter starker Schleimbildung der vorangegangenen Entnahme und läßt auf eine gesonderte Darstellung verzichten.

5.6.3 Oberflächenkolonien aus Multipunktatorbeimpfung von Sporenaufschwemmung auf Bouillon-Pepton-Agar + 1 I.E. Penicillin/ml bei Zimmertemperatur.

Nach 1 Tag waren von den 43 Impfpunkten des Multipunktators nur 19 und nach 15 Tagen insgesamt 24 Kolonien gewachsen. Die ungleiche gegenseitige Hemmung der Kolonien durch den Ausfall von Impfpunkten bewirkte deren sehr unterschiedliche Größe, während sie in der Form nur mit dem dichten Zentrum von der Kontrolle ohne Penicillin unwesentlich abwichen.

Makrokolonie nach 15 Tagen im Medianschnitt

Makroskopische Beschreibung: Kleinere Kolonie mit dichtem Zentrum und unregelmäßigen, undeutlich rechtswendigen Auswüchsen, die von den benachbarten nicht scharf abzugrenzen ist. Durchmesser in Schnittrichtung etwa 7,0 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x) : Unregelmäßiges Profil aus flachen Erhebungen verschiedener Ausdehnung in der Fläche, die durch dünne Ausläufer miteinander verbunden sind. Durchmesser etwa 6,0 mm und maximale Höhe 0,03 mm. Von den erhabeneren Kolonieteilen ausgehendes Tiefenwachstum maximal 0,25 mm in das Substrat.

Im Medianschnitt weicht diese Kolonie mit ihrem Aufbau nicht merklich von der Kontrollbeimpfung ab. Zu langen Ketten verbundene Zellen von im Mittel 3,2 x 1,0 µ sind dicht miteinander verflochten, ohne daß dabei ein besonderes Strukturprinzip erkennbar würde. Das bewegte Profil des Schnittes ist bedingt durch den Aufbau aus zentrifugal wachsenden dicken Strängen, die in diesem Stadium für das Zentrum bereits eine kompakte Anordnung bewirkt haben, während zum Rande hin noch die einzelnen Stränge mit sehr flachen Verbindungen untereinander getroffen sind. Bis in die äußersten Ausläufer weisen die meisten der kaum

gealterten Zellen Sporen auf, die 1,5 x 0,8 µ messen und deutlich dezentriert liegen.

Außer von den jüngsten Teilen am Rande der Kolonie reicht dichtes, aber scharf vom Oberflächenwachstum abgesetztes Tiefenwachstum in das Substrat, das ebenfalls stark versport ist. Unregelmäßig, besonders aber unter dem Koloniezentrum im älteren Tiefenwachstum, finden sich klumpige Zusammenlagerungen von Zellen und Zellketten.

5.7 Bacillus polymyxa

5.7.1 Oberflächenkolonien auf Bouillon-Pepton-Agar:

5.7.1.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung; Lebendbetrachtung in Aufsicht 30 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Der geringe Durchmesser der Zellen und die Teilungsgeschwindigkeit bedingen eine langsamere Entwicklung und Volumenzunahme der Mikrokolonien. Die Einzelzellen von auffällig unterschiedlicher Länge messen im Mittel 5,0 x 0,6 µ. In den jungen Entwicklungsstadien der Kolonien neigen die Zelketten bei der Teilung ihrer Bauelemente zum Auseinanderbrechen, wie es auch bei Bacillus subtilis oder cereus (Glatt-Variante) zu beobachten ist. So entstehen zuerst einschichtige Lagen aus mosaikartigen Gruppen parallel angeordneter Zellen und Zellketten in verschiedenen Winkeln zueinander. Wegen des relativ geringen Durchmessers der Zellen im Verhältnis zu ihrer Länge sowie der Lagerung der Zellgruppen überwiegend parallel oder im spitzen Winkel zueinander haben die Mikrokolonien anfangs eine längliche Form.

Erst mit zunehmender Flächenausdehnung und der Bildung weiterer Schichten durch Empordrücken von Zellen an einer oder mehreren Stel-

len der Kolonien zugleich rundet sich auch deren Umriß weitgehend ab. Mit fortschreitendem Höhenwachstum bleiben durch den Druck der sie umgebenden Zellmassen längere Ketten erhalten, die sich zu Strängen mit welligem Verlauf in horizontaler Ebene vereinigen.

5.7.1.2 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 5 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonie mit opakem Zentrum und schleimig-glänzender glatter Oberfläche. Rand außen durchscheinend, scharf begrenzt. Durchmesser etwa 2, 5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Einheitliche Struktur mit angedeuteter Schichtung. Höchste Erhebung etwas dezentriert 0, 06 mm, Durchmesser 2, 2 mm.

Wegen des auch im Makrokoloniestadium langsamen Wuchses dieses Keimes ist der Koloniedurchmesser trotz der späteren Entnahme auffällig klein. Die Befunde stimmen mit denen der folgenden Entnahme im Alter von 15 Tagen weitgehend überein, so daß für letztere eine gesonderte Darstellung entfallen kann.

Bei der Beurteilung der Schnittbilder fällt die dichte Lagerung der Zellen von einer mittleren Größe von 5, 0 x 0, 5 µ auf. Sie sind nur undeutlich getrennt voneinander zu erkennen. Die Ursache hierfür dürfte in dem geringen Zellendurchmesser zu suchen sein, der einmal eine sehr dichte Aggregation mit nur sehr kleinen Zwischenräumen ermöglicht und andererseits bei gleicher Schnittdicke meist nur angeschnittene Zellen zur Folge hat, die selten mit ihrer gesamten Länge in der Schnittebene liegen. Hiermit wird die Erkennung einer Feinstruktur auf der Grundlage der einzelnen Zelle fast unmöglich. Aber deutlich zeichnet sich dafür die Lagerung der dicken Zellstränge ab, deren Durchmesser bis zu zwei Drittel der Koloniehöhe im Zentrum betragen kann, um in den flachen Randregionen die gesamte Höhe einzunehmen.

Der zentrale und größte Teil der Kolonie zeigt einen Aufbau aus zwei Schichten, der sich erst am Rande im Bereich der starken Höhenabnahme verliert. Im Koloniezentrum sind die Schichten durch eine unregelmäßig gezackt verlaufende Zerreißungslinie in Form kleiner oder größerer, senkrecht ausgerichteter Lücken voneinander getrennt. Deren Richtung ändert sich nach dem Rande zu Zerreißungen oder Schrumpfungslücken, die dem etwa im Winkel von 45° nach außen gerichteten Verlauf der angeschnittenen Zellstränge folgen.

Solche Artefakte von wechselnder Ausdehnung durchziehen die gesamte Kolonie. Infolge der dichten Lagerung der einzelnen Zellen in den Strängen unter starker Verflechtung dürften diese bei Fixation und folgender Entwässerung dort entstehen, wo Stellen geringeren Zusammenhaltes der Bauelemente bestehen und parallel liegende Stränge oder dichterer bzw. lockerer Kolonieaufbau aneinander grenzen.
Die untere der beiden, im Zentrum etwa gleich hohen Schichten ist undeutlicher strukturiert, sehr dicht und deshalb auch dunkler anfärbbar. Hier dürfte sich bereits eine beginnende Alterung abzeichnen. Dagegen ist die obere Schicht, die nach außen an Höhe etwas zunimmt, lockerer aufgebaut aus Zellsträngen, die in Längs- und Querschnitten getroffen sind und vor allem in horizontaler Ebene wellig gewunden liegen. Das weitere Höhenwachstum der Kolonie dürfte vor allem hier erfolgen.

In den Randbezirken verwischt sich diese Schichtung zunehmend und führt zu einer einheitlichen, stark zentrifugal ausgerichteten Strangstruktur.

Alle untersuchten Schnitte dieser beiden Entnahmen zeigten keine versporenden Zellen.

5.7.1.3 Makrokolonie aus Gußbeimpfung nach 35 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Rundliche Kolonien von etwa 6,0 mm Durchmesser, schleimig-glänzend. Zentrum deutlich über die Randregion erhaben, letztere mit "radspeichenartiger" Struktur. Äußere Begrenzung scharf, unregelmäßig eingekerbt.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Schnittumriß entspricht dem makroskopischen Bild. Zentrum annähernd gleichmäßig erhaben, etwa 0,06 mm hoch, und von dort allmählich abfallend. Oberfläche des Randes unregelmäßig leicht gewellt. Am linken Schnittende dicht unter der Kolonie ein ovales Nest von Tiefenwachstum, Koloniedurchmesser 5,2 mm.

Wenn der Unterschied zwischen den Schnittbildern der ersten beiden Entnahmen unbedeutend war, so sind an der 35 Tage alten Kolonie erhebliche Veränderungen festzustellen.

Der zentrale Kolonieteil mit seiner etwa gleichbleibenden Höhe zeigt starke Alterungserscheinungen. Deutlich lassen sich daran, ähnlich den beiden vorgenannten Stadien, zwei Schichten erkennen. Die Basalschicht von geringer Höhe besteht aus weitgehend zerfallenen und klumpig zusammengelagerten Zellen, die sich demzufolge stark anfärben lassen. Es sind noch Andeutungen eines Aufbaus aus welligen Strängen erkennbar. Die Oberschicht mit einer mehrfachen Höhe der Basalschicht zeigt eine gelockerte Struktur und entsprechend geringere Anfärbung bei zahlreichen kleinen Lücken im Gefüge. Auch sie ist stark gealtert, und eine Abnahme der Deutlichkeit an den Resten welliger Struktur wird nach oben sichtbar, wenngleich diese nie völlig zerfallen erscheint.

Die Randzone endet ohne den typischen flachen Zuwachs vieler alter Bacillenkolonien. Bauelemente sind hier wieder deutliche dünne Zellen von etwa 5,0 x 0,5 µ, entsprechen also denen der Entnahme nach 5 Tagen. Hier ist die Kolonie vermutlich noch in langsamem Wachstum begriffen und zeigt einen Aufbau aus Zellsträngen von zumeist Koloniehöhe, die

vor allem in horizontaler Ebene gewunden sind. Die Schrumpfungslücken sind in diesem Kolonieteil größer und besser erkennbar als im zentralen Teil. Oftmals gliedern diese besonders auffällig Strangquerschnitte von ihrer Umgebung ab und lassen darin bisweilen eine Unterteilung in kleinere Stränge erkennen.

Zwischen dieser Randzone und dem zentralen Kolonieteil vollzieht sich ein allmählicher Übergang unter Herausbildung der beschriebenen Zweischichtung und Abnahme deutlich erkennbarer Struktur.

Wiederum war in zahlreichen Schnitten keine Versporung von Zellen festzustellen, während Ausstrichpräparate von Koloniematerial derselben Altersstufe sehr vereinzelt Sporen zeigten.

Die mit diesem Medianschnitt einzige getroffene Stelle von Tiefenwachstum besteht aus scheinbar regellos angeordneten dünnen Stäbchen, die besonders außen dicht gelagert sind und sich kräftig anfärben lassen.

5,7.2 Oberflächenkolonien auf Weizengrießagar:

5,7.2.1 Mikrokolonien aus Ösenbeimpfung von Sporenaufschwemmung, Lebendbetrachtung in Aufsicht 25 Stunden nach Beimpfung und Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien von Bacillus polymyxa ist auch auf Weizengrießagar auffällig geringer als bei den übrigen untersuchten Bacillen, aber doch merklich höher als auf Bouillon-Pepton-Agar.

Die Zellen maßen im Mittel 4,0 x 0,8 µ, wobei der Durchmesser des eigentlichen Zelleibes 0,6 µ beträgt und der Rest auf die Schleimkapsel entfällt, die hier auffällig stark ausgebildet und von Bedeutung auch für die Mikro- und Makromorphologie der Kolonien ist.

Die als Teilungsprodukte entstehenden Zellketten haben die Neigung, in kürzere Bruchstücke von etwa vier Zellen zu zerfallen. Vergleichsweise zu dem Wachstum auf Bouillon-Pepton-Agar ist hier die Länge der Zellen mit im Mittel 4,0 µ etwas geringer. Deutlicher fällt aber der mit der Kapsel erheblich größere Durchmesser von 0,8 µ ins Gewicht, so daß bereits in den jüngsten Stadien abgerundetere Mikrokolonien entstehen. Sie wachsen zu Einschichtstadien aus dicht mosaikartig angeordneten Lagen von Gruppen paralleler Zellen und kurzer Ketten heran, in denen schon frühzeitig ein zentrales Hochdrücken von Bauelementen zur zweiten und bald weiteren Schichten erfolgt. Es scheint, daß die dicke Schleimkapsel der Zellen das Höhenwachstum durch Verminderung der Reibungskräfte mechanisch fördert. Auch hier entstehen vom Zentrum her in der charakteristischen Weise dicke Stränge, wenn so viel Zellmaterial angehäuft ist, daß dieses ein Auseinanderbrechen der Teilungsprodukte hindert, die in der Horizontale gewellt verlaufen. Weitere Einzelheiten sind durch das zunehmende starke Höhenwachstum in den Kolonien mit dieser Methode der direkten Betrachtung nicht mehr erkennbar.

5.7.2.2 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 15 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Kolonie einseitig mit der benachbarten verwachsen. Umriß rundlich, scharf begrenzt. Von gallertiger Konsistenz und trübweißer Farbe. Durchmesser etwa 2,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Einheitlicher, sehr lockerer Aufbau, im Zentrum von der Koloniebasis her wellige Veränderung des Substrates. Nach dem Rande zu allmählich abnehmende Höhe und in dünneren Zuwachsrand auslaufend, der makroskopisch nicht als solcher erkennbar war. Durchmesser 2,9 mm, maximale Höhe im Zentrum 0,05 mm.

Die Koloniestruktur des Bacillus polymyxa auf Weizengrießagar weicht von den Befunden an anderen Keimen auf diesem Nährboden erheblich ab. Die Basis des erhabenen zentralen Kolonieteiles ist unregelmäßig gewellt in das Substrat eingedrungen, ohne mit diesem eigentlich

"verwurzelt" zu sein. Zwischen der Basis mit kompakterem zellulären Aufbau und dem in seiner oberen Begrenzung mit der Sporenfärbung auffällig stark rot anfärbbaren und granuliert erscheinenden Nährboden liegt eine Schicht von der Höhe einer Zellänge (im Mittel 4,8 µ). Diese ist schwach blau anfärbbar und mit verstreuten vegetativen Zellen durchsetzt: Es scheint sich hierbei nicht um eine gleichmäßige artefizielle Ablösung der Kolonie vom Substrat zu handeln, sondern um eine zwischengelagerte Schleimschicht mit wenigen Zellen, wie sie ähnlich auch den zentralen Teil der Kolonieoberfläche bedeckt.

Nun folgt nach oben als dominierender Anteil der Höhenausdehnung die Mittelschicht, in der die Zellen auffällig locker verteilt sind, während die großen Zwischenräume mit zerfallenem Material und vor allem schwach anfärbbarem Schleim erfüllt sind. Die Mehrzahl der Zellen, die oft zu kurzen Ketten verbunden sind, zeigen mit ihrer Längsachse eine senkrechte Ausrichtung. Locker verstreut finden sich zwischen ihnen ohne eine bestimmte Lokalisation Sporen von 2,0 x 0,7 µ und seltener versporende Zellen, deren Leib durch die Spore etwas aufgeblähtist. Die Zellen dieser Schicht liegen an deren Basis am dichtesten und nach oben zunehmend lockerer. Diese Anordnung endet mit einer dünnen Lage von Stäbchen, die ungefähr horizontal ausgerichtet und teils auch quer angeschnitten sind.

Den Abschluß bildet die bereits erwähnte dünne Deckschicht aus Schleim und Zellresten sowie wenigen Einzelzellen oder Zellketten und ganz vereinzelten Sporen. Vorausgesetzt, daß es sich bei dem geschilderten Aufbau nicht um artefizielle Strukturen handelt, würde dieser besonders in der Mittelschicht mit senkrecht orientierten Zellen einen Anklang an die Dreischichtungen bei z.B. Bacillus subtilis und pumilus auf Bouillon-Pepton-Agar erkennen lassen.

Außerhalb des dominierenden zentralen Bereiches liegen die Zellen und Zellketten dichter. Teilweise lassen sie eine gerichtete Anordnung ver-

missen, sind verklumpt, und die Schichtung wird zunehmend undeutlicher. An einigen Stellen sind Andeutungen von Zellsträngen in Längs- und Querschnitten zu erkennen, die vermutlich durch starke Schleimeinlagerung undeutlich sind. Auch hier finden sich verstreut freie Sporen bzw. versporende Zellen bis in den äußersten Zuwachsrand.

5.7.2.3 Makrokolonie aus Ösenbeimpfung nach 35 Tagen bei Zimmertemperatur im Medianschnitt.

Makroskopische Beschreibung: Dick-erhabene, rundliche Gallertkolonie mit weißlichem, eingedellt erscheinendem Zentrum. Glänzend, winziger, scharf begrenzter Zuwachsrand. Durchmesser etwa 3,5 mm.

Schematische Beschreibung des Schnittbildes (Übersicht, 125 x): Erhabene, einheitlich aufgebaute Kolonie mit geringfügig dezentrierter höchster Erhebung von etwa 0,19 mm und einem Durchmesser von 3,2 mm. Profil stetig abfallend, randwärts mit zwei weiteren geringfügig herausragenden Erhöhungen.

Gegenüber der vorgenannten Entnahme hat diese Kolonie an Flächen- und Höhenausdehnung erheblich zugenommen. Sie ist aber durchweg sehr stark gealtert und läßt in ihren Strukturresten kaum noch Beziehungen zu jüngeren Stadien erkennen.

Der größte Teil der Kolonie besteht aus Schleim mit locker netzartig eingelagerten Zellresten, die sich bläulich anfärben. Besonders im rechten Teil des Schnittes sind sicherlich artefizielle, lappenartige Verdichtungen der Grundsubstanz zu erkennen. Die Koloniebasis besteht aus kaum anfärbbaren blasigen Zellen verschiedener Größe. Darüber liegt eine mit der Sporenfärbung stark rot anfärbbare Schicht aus dichten Granula, die sich unter der etwa zentralen höchsten Erhebung hügelig verdickt.
An den Kolonierändern sind deutlichere Strukturreste erhalten geblieben aus parallelen Lagen von Zellsträngen, die einen bogigen Verlauf nach außen und zurück nach oben nehmen. Der obere Teil dieser Randpartie

ist locker mit Sporen durchsetzt, die sich verschieden stark anfärben lassen. Sie liegen mit ihrer Längsachse meist parallel zum Verlauf der Strangreste, in die sie eingebettet sind. Auch der übrige Teil der Kolonie ist unregelmäßig versport bis auf den äußersten dünnen Zuwachs aus intakten, schlanken Zellen stärkerer Anfärbbarkeit.

6. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

6.1 Erhaltungszustand und Qualität der Schnittpräparate in Zusammenhang mit Vorbehandlung und Schnitt-Technik

Die Grundlage für die Gewinnung brauchbarer Schnittpräparate von Bakterienkolonien ist eine geeignete Einbettungsmethodik einschließlich der Vorbehandlung.

Besonders erschwerend erwiesen sich bei diesen Untersuchungen der meist nur geringe Zusammenhalt der Bauelemente in den Kolonien im Gegensatz zu soliden Geweben sowie das leicht bereits bei der Fixation eintretende teilweise oder völlige Ablösen von dem stark wasserhaltigen Substrat.

Die Gewinnung brauchbarer Schnittpräparate scheint aber, erprobte Methoden vorausgesetzt, nicht nur von diesen selbst, sondern auch von der Sorgfältigkeit und praktischen Erfahrungen abzuhängen, mit denen sie durchgeführt werden. Wenngleich die bisher angewendeten Methoden zur Gewinnung von Bakterienkolonieschnitten durchaus herkömmlicher und konventioneller, also der Histologie entlehnter Art sind, weisen die insgesamt nur wenigen erfolgreichen Untersuchungen zur Feinstruktur von Bakterienkolonien u.a. wohl auch auf Schwierigkeiten praktisch-technischer Art hin. So war bei uns die Einbettung in Cremolan nach STÖSS (1955) erfolglos, und verschiedentlich wurde anderwärts über Mißerfolge mit sonst erprobten Methoden berichtet (z.B. ZOSEL 1922; KAHN u. NONIDEZ 1936; BINGEL 1947).

Nach den Erfahrungen an Vorversuchen, die nicht auf Sporenbildner beschränkt blieben, erwiesen sich verschiedene Methoden als brauchbar. Die dann für die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich angewendete Vorbehandlung, Fixation und Entwässerung mit iso-Propanol und nachfolgender Einbettung in PARAPLAST (siehe 4.2.5.2) wurde neben den

damit erhaltenen zufriedenstellenden Ergebnissen vor allem auch wegen der relativ einfachen und zeitsparenden Handhabung vorgezogen. Dabei erwiesen sich die Kolonien der Bacillen auf Grund bestimmter, wenn auch nicht jeweils bei allen der untersuchten Species und Varianten vorkommenden Merkmale und Eigenschaften wie z.B. Zellgröße, Ketten- und Strangbildung und Verwachsen mit dem Substrat als besonders geeignet für derartige Untersuchungen im Schnitt.

6.1.1 Defekte und Artefakte

Auch bei guter Beherrschung der Methodik zeigte sich, daß das Auftreten oder Ausbleiben von Schädigungen an den Kolonien bzw. deren Schnitten nicht vorauszusagen ist und erheblich wechselt unter scheinbar gleichbleibenden äußeren Einflüssen. Dies deutet auf ein komplexes Zusammenwirken zahlreicher schädigender Einflüsse verschiedenen Ausmaßes hin. Von besonderer Bedeutung ist das oft unterschiedliche Schrumpfen von Substrat- bzw. Schutzschichtagar an den Entnahmeblöckchen bei der Entwässerung und Einbettung, so daß erhebliche Krümmungen und deren Folgen auftreten, die sich besonders an großflächigen Kolonien nachteilig bemerkbar machen.

So unerwünscht Defekte und Artefakte einerseits sind, so ermöglichen sie andererseits z.B. gewisse Aufschlüsse über den Kolonieaufbau und dessen Zusammenhalt zu geben, die sonst nur undeutlich oder garnicht zu erkennen wären (z.B. sich kreuzende Zellstränge in den dichten Kolonien von Bacillus polymyxa). Deshalb sollen im folgenden einige häufiger an Kolonieschnitten zu beobachtende Schädigungen und Artefakte aufgezählt werden, die durch Vorbehandlung bedingt sind:

6.1.1.1 Völliges oder teilweises Ablösen der Kolonie von dem umgebenden Agar ohne stärkere Beschädigung

Diese Erscheinung tritt bevorzugt bei jungen Koloniestadien auf und bei

älteren nur dann, wenn wegen geringer Alterung die Struktur noch erhalten ist. Die Verflechtung von Zellketten und -strängen gibt der Kolonie erhebliche Festigkeit und fördert den Zusammenhalt. Dabei kann die Koloniebasis unter geringer Auflockerung vom Substrat gelöst sein wie bei Bacillus subtilis oder Bac. cereus (Glatt-Variante), wo auch eine Ablösung von dem überschichteten Agar eingetreten ist. Bei letzterem Schnitt ist zusätzlich noch das Kolonieende abgerissen, woraus auf ein stärkeres Schrumpfen in horizontaler Richtung bei der Entwässerung für die Bakterien gegenüber dem Agar zu schließen ist. Das Abreißen der äußersten Kolonieenden war häufig zu beobachten, so z.B. auch bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) oder Bacillus pumilus.

6.1.1.2 Völliges oder teilweises Ablösen der Kolonie von dem umgebenden Agar unter stärkerer Beschädigung

Beispiele hierfür finden sich verschiedentlich, wie bei Bacillus pumilus oder Bacillus cereus (Glatt-Variante). Die Verbindung von Koloniebasis und Substrat ist demnach teilweise stärker als der Zusammenhalt der Zellen untereinander, ohne daß ersteres durch sog. Tiefenwachstum bedingt wäre. Zwischen Defekten dieser Art und den unter 6.1.1.3 genannten bestehen vielfach fließende Übergänge.

6.1.1.3 Rißartige Koloniedefekte an Schichtgrenzen oder den Berührungsflächen von Zellsträngen

In charakteristischer Weise ist die erstgenannte Erscheinung für Bacillus pumilus (5.3.1.3) zu sehen. Das Auftreten solcher Zerreißungen von oft erheblicher Ausdehnung deutet auf nur geringe oder fehlende Verbindungen und Verflechtungen zwischen voneinander abgesetzten Schichten hin. Auf diese Weise können sich auch innerhalb der Kolonie Spalträume

bilden, die meist sehr regelmäßig gestaltet und nicht völlig "leer" von Zellen sind, so daß u. U. Zweifel entstehen, ob es sich dabei überhaupt um artefizielle Erscheinungen handelt.

Ein Sonderfall soll unter dieser Rubrik erwähnt werden, der an einer 10 Tage alten Kolonie von Bacillus cereus (Glatt-Variante) gefunden wurde. Dort ist die Mittelschicht etwa im Verlauf der stärksten Versporung, und damit des geringsten Zusammenhaltes, auseinandergewichen.

Zerreißungen von meist nur geringer Ausdehnung an der Berührungsgrenze von Zellsträngen sind besonders ausgeprägt und zahlreich bei Bacillus polymyxa auf BPA zu finden. Die Ursache hierfür wird in der dichten Lagerung und Verflechtung der Zellen bei nur geringem Durchmesser innerhalb der einzelnen, voneinander abgegrenzten Zellstränge zu suchen sein. Bei der Schrumpfung nach Wasserentzug bleibt dann der Zusammenhalt der Zellen in den einzelnen Strängen stärker gewahrt als derjenige der benachbarten Stränge untereinander. Ähnliche Erscheinungen sind auch an Kolonieschnitten von Mycobacterium tuberculosis bei LEWICKI (1958) zu beobachten.

6.1.1.4 Einheitliche netzartig-lückige Strukturen

Hierbei handelt es sich um artefizielle Strukturveränderungen einheitlicher Art, die an ähnliche Erscheinungen bei ursprünglich weitgehend homogenen Substanzen wie Agargel oder Protoplasma nach Fixation und Entwässerung erinnern. Sie sind charakteristisch für stark gealterte Kolonien, in denen der primäre zelluläre Aufbau weitgehend geschwunden ist und an dessen Stelle schleimige Zerfallsprodukte, Zellreste und Sporen getreten sind, die durch Fixation und Wasserentzug netzartig-lückig verändert werden.

Grundsätzlich erwiesen sich für einen guten Erhaltungszustand von Kolonieschnitten der untersuchten Species folgende Eigenschaften als förderlich:

a. Einheitliche und innige Verflechtung von Zellketten und -strängen aus langen Bauelementen, die nur geringe Neigung zum Auseinanderbrechen besitzen,

b. geringe Versporung bzw. geringe Anzahl freier Sporen,

c. einheitliche Koloniebaufbau, also Fehlen deutlich voneinander abgesetzter Schichten, und

d. ausgedehnte und innige Verwachsung der Koloniebasis mit dem Substrat.

Am weitesten genügten diesen Anforderungen Kolonien von Bacillus mycoides (Rauhform), deren Feinstruktur dafür aber, entgegen dem auffälligen makroskopischen Bild, nur relativ einförmig und arm an spezifischen Aussagen ist.

Der Grad der Koloniealterung scheint nach den vorliegenden Befunden weniger Einfluß auf den Erhaltungszustand zu haben, vor allem in Hinsicht auf grobe Defekte, weil Versporung und Zerfall der vegetativen Zellen den Zusammenhalt von der Primärstruktur her einerseits verringert, dies aber andererseits durch die Bildung schleimig-zäher Zerfallsprodukte kompensiert wird. Damit ist oft auch eine Komprimierung der Koloniesubstanz verbunden, die ebenfalls zur Festigung beiträgt. Hierfür spricht auch das völlige Fehlen von Defekten im Bereich der sog. "komprimierten Zerfallsschichten" älterer Kolonien, z.B. 5.5.1.4. Für die verwendeten agarhaltigen Nährböden zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Fehlens oder Auftretens von Defekten und Artefakten.

6.1.2 Der Einfluß von Vorbehandlungen auf Morphologie und Größe der einzelnen Zellen

Trotz der während der Entnahme, Fixation, Entwässerung und Einbettung auf die Bakterienkolonie einwirkenden schädigenden Einflüsse erwies sich der Erhaltungszustand der Einzelzellen im allgemeinen zufriedenstellend. Schrumpfungen an der Gesamtkolonie oder an ihren Teilen sind aber letzlich durch solche an den einzelnen Bauelementen bedingt. Grundsätzlich stellen die angegebenen Maße von Koloniedurchmesser und -höhe, Länge und Durchmesser von Einzelzellen usw. lediglich annähernde Mittelwerte dar. Wurden diese Schnittpräparaten entnommen, so sind als Folge der Vorbehandlungen stets Abweichungen von den Gegebenheiten in vivo anzunehmen, bei denen Schrumpfen durch Entwässerung am stärksten in Erscheinung treten wird. Der Grad der Abweichungen wäre annähernd nur durch Lebendmessung von Zellen ähnlicher Kolonien derselben Petrischale zu erfahren. Der meist erhebliche Größenunterschied (morphologische Unterschiede interessieren an dieser Stelle nicht) zwischen lebenden Zellen aus Mikrokolonien und solchen aus Makrokolonieschnitten vor allem älterer Stadien können hierfür nicht herangezogen werden, da die einzelnen Entwicklungsphasen einer Bakterienkultur ebenfalls in der Größe der Zellen voneinander abweichen.

Daß auch die Färbmethode von Bedeutung für den Erhaltungszustand der Zellen ist, zeigten Vergleiche von Serienschnittpräparaten nach der Färbung mit Viktoriablau bzw. der vielfach verwendeten Sporenfärbung nach KLEIN, die ein Erhitzen des Präparates bis zum Sieden des Karbolfuchsins erfordert. Die Zellen von Schnitten nach der Sporenfärbung erwiesen sich dabei durchweg als kleiner, also geschrumpft, und waren vielfach in ihren Konturen unregelmäßig verändert.

6.1.3 Die Bedeutung der Schnittdicke für die Auswertung der Präparate

Die Dicke der Kolonieschnitte erwies sich als bedeutungsvoll für die Möglichkeit von Aussagen über Größe und Morphologie der Zellen und ihre Lage zueinander, also dessen, was sich als Feinstruktur einer Bakterienkolonie zusammenfassen läßt. Wegen der geringen Größe von Bakterienzellen muß eine leistungsfähige Schnittmethodik Schnittdicken unter 5 µ ermöglichen. Nach unseren Erfahrungen mit verschiedenen Sporenbildnern neben anderen Bakterienarten unterschiedlicher Größe einschließlich der Gattung Streptomyces möchten wir als durchschnittlichen Wert für die Schnittdicke 2 - 3 µ fordern, der mit der bereits geschilderten Methodik zu erreichen ist und den vorliegenden Untersuchungen zugrunde liegt. Keinesfalls kann aber STÖSS (1955) zugestimmt werden, der ein Einbettungsmittel, mit dem nicht die Stärke von 1 µ erreicht werden kann, als für bakteriologische Zwecke unbrauchbar bezeichnet. Vielmehr ist zu berücksichtigen, daß die optimale Schnittdicke neben der Art der Untersuchungen vor allem von dem jeweiligen Keim, dessen Größe und der Dichte der Lagerung von Einzelzellen zueinander abhängt, aber auch der Erhaltungszustand und damit das Alter der zu schneidenden Bakterienkolonien sind hierfür von Bedeutung.

Verschiedentlich konnte festgestellt werden, daß es auch innerhalb eines Schnittes wegen der unterschiedlich dichten Lagerung der Zellen in dessen einzelnen Teilen keine durchweg optimale Dicke gibt.

Lediglich bei Bacillus polymyxa auf Bouillon-Pepton-Agar war es bei einer Schnittdicke von 2 µ nicht möglich, die Feinstruktur auf der Grundlage der Einzelzellen sicher zu erkennen, weil hier die dichte Anordnung der dünnen Zellen (etwa 5,0 x 0,5 µ) eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Bauelemente nur selten zuläßt. Aber auch ab und zu erhaltene dünnere Schnitte dieser Entnahmen ließen die gewünschte Deutlichkeit vermissen, so daß auch für solche Untersuchungen der Eignungsgrad bestimmter Objekte auf Grund von Eigenschaften, insbesondere des Zellendurchmessers, unterschiedlich sein wird.

6.2 Vergleichende Kolonieentwicklung, Mechanismen der Koloniee-ntwicklung

6.2.1 Mikrokolonie-Entwicklung

Als Mikrokolonien werden von uns die jungen Koloniestadien, im allgemeinen mi t einem Alter unter 24 Stunden, bezeichnet, deren Entwicklung nach der Beimpfung des Substrates mit der einsetzenden Zellteilung beginnt, in Anlehnung an die sinngemäße Verwendung dieses Begriffes bei FORTNER (1951), POETSCHKE (1957) und SCHARIKOVA et al. (1966).

Im einzelnen erwiesen sich die Zeiten bis zum Beginn der Sporenkeimung als sehr unterschiedlich, so daß Altersangaben für Mikrokoloniestadien, auf die verstrichene Zeit seit der Beimpfung bezogen, wenig Aussagewert besitzen.

Die Beobachtung lebender Bakterien in den Mikrokolonien ermöglicht bedeutungsvolle Einblicke in das Entwicklungsgeschehen der werdenden Kolonien und ergänzt die Befunde an Hand von Kolonieschnitten auf sinnvolle Weise. So verwundert es, daß trotz erfolgversprechender Ansätze bei HUTCHINSON (1907), SCHUBERT (1920), ROELCKE u. BARTRAM (1938/39), FORTNER (1951) und ULBRICH (1955) diese Methode anscheinend nur wenig Verwendung gefunden hat, wenngleich die Frage nach dem Entstehen spezifischer Bakterienkolonieformen des öfteren gestellt worden ist.

Für die untersuchten Species ließen sich grundsätzlich zwei unterschiedliche Formen der Mikrokolonieentwicklung feststellen, die an Bacillus subtilis bzw. cereus als Modellfälle auf BPA erläutert werden sollen.

1. Bacillus subtilis.

Als von grundlegender Bedeutung für die Morphologie und Feinstruktur der Kolonien erwies sich das Zusammenhalten oder Auseinanderweichen der Zellen, die immer zu einer gewissen Kettenbildung neigen, sowie der Grad ihrer Starrheit, d.h. ihres Bestrebens, eine etwa lineare Ausrichtung beizubehalten. Während der Teilung aller ihrer Zellen ("interkalares Wachstum" nach PRINGSHEIM u. LANGER (1924)) und der damit verbundenen Verlängerung der Zellketten gleiten diese mit Hilfe ihrer Schleimkapsel und des Flüssigkeitsfilmes über die Substrat-

oberfläche.

Bei Bacillus subtilis knicken die anfangs etwa linear ausgerichteten Zellketten rasch ab und zerfallen in kleinere Bruchstücke von maximal 6 Bauelementen, die sich häufig zu parallelen Gruppen anordnen. Durch das fortgesetzte Auseinanderbrechen der Zellketten und die zunehmende Anzahl von Bauelementen wird das zu Beginn "nur nach einer Linie orientierte Wachstum in das einer Fläche verwandelt" (SCHUBERT (1920)). Die auf diese Weise entstehende flächig-einschichtige Zellaggregation füllt durch die unterschiedlichen Wachstumsrichtungen ihrer einzelnen und sich gegenseitig hemmenden Teile vorhandene Lücken im Gefüge aus, wobei der Umriß der Mikrokolonien eine mehr oder weniger starke Abrundung erfährt (umso vollkommener, je geringer der Unterschied zwischen Länge und Durchmesser der Zelle ist und je kleiner die Bruchstücke der Zellketten sind). Diese Abrundung stellt insbesondere für die Mehrzahl der makroskopisch sichtbaren Bakterienkolonien ein auffälliges Merkmal dar, das allerdings verschiedensten Abwandlungen unterworfen sein kann.

Charakteristisch ist für dieses Mikrokoloniestadium ein Aufbau aus etwa mosaikartigen Gruppen parallel gelagerter kurzer Zellketten und Einzelzeilen. Ähnlich einschichtige Mikrokolonien sind beschrieben und abgebildet bei SCHARIKOVA et al. (1966) für Bacillus brevis (S-Form) als "Schachbrettanordnung" der Zellen, die durch das Vorherrschen der sog. "brechenden Teilung" bedingt sein soll.

Die Dynamik wachsender Mikrokolonien und das Kräftespiel in diesen werden in eindrucksvoller Weise mit dem Beginn des Höhenwachstums demonstriert. Die einschichtigen Stadien gewinnen den Raum für die mit jeder Zellteilung hinzukommenden Zellen durch Verschieben ihrer Bauelemente nach außen, also vom Koloniezentrum aus gesehen in zentrifugaler Richtung. Für die Einzelzellen werden dabei aber auch von der

Kolonieperipherie zum Zentrum hin Kräfte in zentripetaler Richtung wirksam (HUTCHINSON (1907)). Denn mit der zunehmenden Verschachtelung und dem damit wachsenden Zusammenhalt der Bauelemente nimmt die Reibung auf dem Substrat zu, so daß die Flächenzunahme nicht mehr allein durch ein Auseinanderweichen und Verschieben nach außen ausgeglichen werden kann. Zwangsläufig erfolgt so das Höhenwachstum durch Hochdrücken von Zellen, um dem zentripetalen Druck auszuweichen. Fast immer erfolgt dies für gleichmäßig rundliche Kolonien nur von einer Stelle in der Koloniemitte aus unter Überwindung der Schwerkraft und des Haftens der Zellen aneinander und am Substrat. Die Zellen werden beim Hochdrücken in ihrer anfangs ausschließlich mit der Längsachse parallel zur Unterlage befindlichen Position verändert und liegen teilweise senkrecht zu dieser, um eine zweite Schicht zu bilden, der weitere folgen. Diese Zellen breiten sich ihrerseits wieder stark zentrifugal und parallel zu ihrer jeweiligen Unterlage aus, so daß der Kolonierand gut die abgestuften Schichten erkennen läßt, während das Koloniezentrum unübersichtlicher wird.

Nachdem nun die äußere Form der peripher noch gleichmäßig geschichteten Mikrokolonien mit rundlichem Umriß und zentraler, durch das Höhenwachstum bedingten, Erhebung festgelegt ist, läßt sich der Beginn einer anderen Strukturierung vom Zentrum her erkennen, indem aus parallelen Zellketten Stränge entstehen, die anfangs etwa in horizontaler Ebene wellig gewunden sind und nach außen streben. Diese Strangbildung scheint im Gegensatz zu stehen zu dem leichten Auseinanderbrechen der Zellketten in früheren Entwicklungsstadien. Aber es ist anzunehmen, daß kein grundsätzlicher Wechsel im Grad des Zusammenhaltens der Zellen einer jeden Kette eingetreten ist. Vielmehr nimmt mit fortschreitendem Wachstum der Kolonien in die Höhe und in die Breite die Zahl der an der Oberfläche befindlichen und damit von benachbarten am wenigsten gehemmten Zellen ab, während die der im Kolonieverband eingeschlossenen Zellen zunimmt. Hierbei entsteht innerhalb der Kolonie ein Binnendruck, der im Zentrum am stärksten ist und ein Knicken und Auseinanderbrechen der

Zellketten weitgehend verhindern wird.

Diese Befunde und deren Deutung stimmen mit denen von HUTCHINSON (1907) und SCHUBERT (1920) bei Bacillus subtilis völig überein und ergänzen diese teilweise.

2. Bacillus cereus.

Im Gegensatz zu den Mikrokolonien von Bacillus subtilis zeigen die langen Zellen dieser Species eine auffällige Tendenz zum Zusammenhalt und damit der Entstehung vielgliedriger Zellketten, deren starre, etwa lineare Ausrichtung an Bacillus mycoides erinnert. Hierdurch wird die Bildung fädiger und locker auseinanderstrebender Kolonien gefördert. Hindernisse wie Substratunebenheiten, Zellen und Zellketten selbst sowie Abweichungen von der linearen Ausrichtung und die zunehmenden Reibungskräfte langer Zellketten bewirken deren Richtungsänderungen, Schleifenbildungen und vereinzeltes Auseinanderbrechen. Wegen der Starrheit der Zellketten lagern sich diese nicht immer parallel an bereits vorhandene an und gleiten aneinander entlang, wodurch frühzeitig Zellstränge entstehen können, sondern vermögen diese auch bei Auftreffen im stumpfen bis rechten Winkel zu kreuzen, so daß Höhenwachstum bzw. Mehrschichtigkeit ohne zentrale Lokalisation an mehreren Stellen zugleich erfolgt im Gegensatz zu Bacillus subtilis. Aber auch diese anfangs sehr unregelmäßig umrissenen Mikrokolonien runden sich mit zunehmendem Höhenwachstum vom Zentrum her ab. Die freien Flächen zwischen den Zellketten und -strängen werden dabei allmählich ausgefüllt, wenngleich die Kolonieränder immer durch unregelmäßige Ausläufer und Schlingen bestimmt bleiben. In den älteren Stadien entstehen dicke Zellstränge, die in horizontaler Ebene wellig und ineinander verschlungen angeordnet sind und zum Rand hin auch abgestuft liegen können.

Diese beiden unterschiedlichen Entwicklungsgänge von Mikrokolonien

lassen sich Befunden an den verschiedensten Bakterienspecies und Verwandschaftsgruppen zuordnen, die zuerst bei Makrokolonien Beachtung fanden und von ARKWRIGHT (1919/20) als Glatt- (=S) bzw. Rauh-Formen (=R) benannt wurden (siehe auch unter 2.2.1.1 sowie 6.5) . Diese Erscheinungen waren aber bereits früher bekannt und so beschrieb z.B. PREISZ (1911) Kolonievarianten von Bacillus anthracis mit glattem bzw. rauhem Rand. Die typischen Formen von Bacillus anthracis mit den sog. "Medusenhaupt-Kolonien" und Bacillus mycoides gelten als Musterbeispiele rauher Bakterienkolonien.

Unsere Befunde bei mehreren Species (und deren Varianten) der Gattung Bacillus stimmen weitgehend oder wenigstens für einzelne Stadien mit den Befunden von PREISZ (1911) sowie anderer Autoren überein (z.B. NEUMANN 1930; STAPP u. ZYCHA 1931; BISSET 1938; ROELCKE u. INTLEKOFER 1938; ROELCKE u. BARTRAM 1938/39; ULBRICH 1954; POETSCHKE 1957; SCHARIKOWA et al. 1966). Somit scheint es sich um ein Phänomen bei der Entwicklung von Bakterienkolonien zu handeln, das allgemeine Verbreitung zeigt und dem jeweils die gleichen Ursachen zugrunde liegen.

Der am Modell Bacillus subtilis (bei dessen Stamm glatte Kolonien dominieren) dargestellte Entwicklungsgang entspricht demnach der Glatt-Form und konnte auch für eine stabile Variante von Bacillus cereus sowie Bacillus polymyxa bestätigt werden. Der zweite Entwicklungsgang, dargestellt am Modell Bacillus cereus (dessen Ausgangsstamm praktisch einheitlich in rauhen Kolonien wächst), entspricht der Rauh-Form und gilt auch für Bacillus mycoides.

Grundsätzlich handelt es sich aber wohl bei den rauhen bzw. glatten Kolonieformen gewissermaßen um Extremwerte, die durch fließende Übergänge verbunden sein können und deren Grad der Ausprägung innerhalb einer Species im einzelnen sehr verschieden ist. (Auf physiologische und vor allem serologische Besonderheiten dieser Formen soll hier nicht eingeangen werden).

Hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes waren die Mikro- und Makrokoloniestadien miteinander übereinstimmend und blieben konstant bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) und Bacillus polymyxa als S-Form sowie Bacillus cereus und Bacillus mycoides als R-Form. Abweichungen davon zeigten Bacillus pumilus und subtilis.
Lediglich Bacillus pumilus ließ sich von den untersuchten Species im Mikrokoloniestadium nicht einer der beiden Extremformen zuordnen, sondern erwies sich durchweg als intermediär zwischen beiden. Aber bereits im Alter von 24 Stunden waren sämtliche Kolonien makroskopisch weitgehend als Glatt-Formen anzusprechen, deren Grad der "Glattheit" noch mit zunehmendem Alter wuchs.

Anders verhielt sich Bacillus subtilis, der im Rahmen zahlreicher Abimpfungen von "rein" glatt erscheinenden Kolonien dominierend auch Glatt-Formen aufwies, die aber ab und zu in Form von Auswüchsen des Randes rauhe Anteile enthielten. Auf jeder Petrischale befanden sich neben überwiegend glatten Mikrokolonien einzelne intermediäre und "rein" rauh erscheinende, von denen die letzteren während der weiteren Verfolgung ihrer Entwicklung sich aber auch zu glatten Kolonien auswuchsen und höchstens am Rand vereinzelt Unregelmäßigkeiten aufwiesen. Bei beiden Species handelt es sich also um ähnliche Erscheinungen des Wechsels von intermediär oder rauh zu glatt, die aber, wie wir meinen, unterschiedlich zu deuten sind.

Soweit uns bekannt ist, wurden bislang die Größenänderungen von Zellen einer wachsenden Bakterienkultur im Laufe der verschiedenen Entwicklungsphasen wie Anlaufphase, logarithmische Wachstumsphase, stationäre Phase usw. (HAWKER et al. 1962; THIMANN 1964) in Hinsicht auf Morphologie und Feinstruktur der Bakterienkolonien nicht berücksichtigt. Auf die Bedeutung dieser Phasen weist WINKLER (1956) ausdrücklich hin, wenn auch in Zusammenhang mit anderen Fragestellungen. Beim Vergleich der Zellengröße von Mikrokolonien und Makrokolonieschnitten ergaben sich deutliche Unterschiede in den Maßen, so z. B. (auf BPA,

Durchschnittswerte)

für Bacillus pumilus	8,9 x 1,2 µ (nach 15 Stunden) und 5,0 x 0,5 µ (nach 1 Tag),
für Bacillus subtilis	5,0 x 1,3 µ (nach 15 Stunden) und 3,2 x 0,7 µ (nach 5 Tagen) sowie
für Bacillus cereus	12,0 x 2,0 µ (nach 15 Stunden) und 5,0 x 1,0 µ (nach 2 Tagen).

Diese Unterschiede bleiben auch noch augenfällig, wenn für die Makrokolonieschnitte ein Teil der Größendifferenz als Schrumpfungseffekt nach Fixation und Entwässerung angenommen wird (siehe auch unter 6.1.2). Werden Morphologie und Erscheinungsbild von Bakterienkolonien als Funktion der Gestalt und Eigenschaften ihrer Bauelemente angesehen, dann können auch derartige Veränderungen der Zellengröße nicht ohne Auswirkungen bleiben. Vielleicht bewirken diese für Bacillus pumilus das zunehmende "Glattwerden" der Makrokolonien, an dem obendrein die zunehmende Schleimabsonderung der Zellen Anteil hat.

Dagegen dürften diese Veränderungen der Zellengröße für die Deutung der Befunde bei Bacillus subtilis von untergeordneter Art sein. Die Kultur erwies sich grundsätzlich hinsichtlich der Zuordnung zu einer Kolonieform im Mikro- wie Makrobereich als unstabil mit der Tendenz auf das Dominieren der Glatt-Form. Vermutlich handelt es sich um eine Mischpopulation von Glatt- und Rauhformen als Folge von Mutationen, in der durch Trennung der Komponenten, z.B. bei der Aussaat, jüngste Koloniestadien rein erscheinen, während sich im Laufe der weiteren Entwicklung, möglicherweise durch einen Wachstumvorsprung, die glatte Komponente zunehmend anreichert. (An dieser Stelle sei betont, daß unsere Befunde und verallgemeinernden Feststellungen stets für Standardbedingungen auf Bouillon-Pepton-Agar (BPA) gelten, falls dies nicht anders aufgeführt wird).

Wenn in der Literatur über die Strukturenunterschiede von Glatt- und Rauh-

Formen uneinheitliche Meinungen dargelegt wurden, vor allem bei Enterobacteriaceen (HADLEY 1927; BISSET 1938; PRITTWITZ u. GAFFRON 1952; SCHNEWEIS 1959), so sind diese möglicherweise einmal dadurch bedingt, daß die Ergebnisse auf unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und Kulturbedingungen beruhen und zum anderen die Kolonieentwicklung nicht über längere Zeit vom Mikro- zum Makrostadium verfolgt wurde. Neben anderen Einflüssen, die z.T. bereits genannt sind, scheint besonders das Nährmedium modifikativen Einfluß auf die Ausprägung des Glatt-Rauh-Phänomens zu besitzen (KRÖGER 1953/54).

Die Rolle des Schleimes für das Erscheinungsbild einer Bakterienkolonie wurde schon bei Bacillus pumilus angedeutet. Neben den beiden "Extremformen" S und R und anderen, die in diesem Zusammenhang ohne Bedeutung sind, wurde auch eine Mucosus- oder Schleim-Form (=M) beschrieben, bei der es sich um besonders stark bekapselte und schleimabsondernde Varianten der S- bzw. R-Form handeln dürfte und der Schleim vorhandene Rauheigenschaften gewissermaßen "maskiert", während umgekehrt Glatteigenschaften betont werden. Bei den untersuchten Species trat die Schleim-Form nur bei dem sonst auf BPA einheitlich glatt- und schwachwüchsigen Bacillus polymyxa auf. Dieser zeigte auf Weizengrießagar, auf dem die Formen mehr oder weniger rauh wuchsen, bereits im Mikrokoloniestadium eine auffällige Bekapselung der Zellen, die zur schnellen Abrundung der Zellaggregate führte. Das Wachstum schien im weiteren Verlauf gegenüber BPA forciert, beruhte aber weniger auf einer schnelleren Zunahme von Zellen selbst, sondern war durch deren hohen Schleimanteil bedingt. Die schleimig-feuchten und stark erhabenen Makrokolonien entsprachen denen, wie sie als typische M-Form z.B. von Klebsiella pneumoniae bekannt sind. Von der Struktur her handelt es sich aber bei Bacillus polymyxa um eindeutige S-Formen, wenn auch modifizierter Art, so daß wir die Verwendung eines besonderen und möglicherweise bestehende Strukturunterschiede verschleiernden Terminus für nicht angebracht halten.

Weil die charakteristische Gestaltung der Kolonien von Bacillus mycoides mit der Ausbildung sog. "einseitwendiger Spiralen" oder Kolonieausläufer bereits im Mikrokoloniestadium beginnt, soll die Diskussion dieses Phänomens auch unter 6.2.1 erfolgen und dieses Kapitel abschließen.

Das eigentümliche Koloniewachstum von Bacillus mycoides als extreme Rauhform war zunächst nur von sog. linkswendigen Stämmen (d.h. Krümmung der Kolonieausläufer gegen den Uhrzeigersinn) bekannt (HOLZ - MÜLLER 1909; PRINGSHEIM 1918), aber inzwischen sind auch rechtswendige Stämme bekannt geworden (z.B. OESTERLE u. STAHL 1929; STAPP u. ZYCHA 1931; LEWIS 1933; v.KLOPOTEK 1969). Spiralig gekrümmte Kolonieausläufer sind aber nicht auf Bacillus mycoides beschränkt, sondern konnten von uns auch an älteren Kolonien von Bacillus cereus (als dessen Varietät Bacillus mycoides angesehen wird) auf Weizengrießagar festgestellt werden. BOAS (1919) und BERGDOLT (1931) beschreiben Kolonien von Oidium lactis, die zwar dichter als solche von Bacillus mycoides erscheinen, aber ebenfalls deutlich aus spiralig gekrümmten Strängen in dichter Anordnung bestehen.

Die rauhe Kolonieform galt für Bacillus mycoides als artspezifisch, bis STAPP u. ZYCHA (1931) nachweisen konnten, daß scheinbar spontan wie auch als Folge bestimmter Kulturmethoden "typischen" Stämme das spiralige Wachstum verlorenging und diese als mehr oder weniger stabile S-Formen mit abweichender Kolonieform weitergeführt werden konnten. S-Formen wurden auch von denselben Autoren direkt aus Böden isoliert, so daß wahrscheinlich beide Formen nebeneinander in der Natur vorkommen.

Während bekannt war, daß unterschiedliche Kulturbedingungen zwar das Aussehen der Kolonien zu verändern vermochten (HOLZMÜLLER 1909 ; PRINGSHEIM u. LANGER 1924), wurde die jeweilige Krümmungsrichtung der spiraligen Ausläufer als konstant angesehen. Kürzlich gelang es aber v. KLOPOTEK (1969), linkswendige Stämme in "gemischte" und rein rechtswendige durch Nährbodeneinflüsse zu überführen. Von 8 Stämmen wuchsen auf dem Grundsubstrat Fleisch-Hefe-Agar (pH 7) 7 links- und 1 rechtswendig. Davon blieben der rechtswendige und ein linkswendiger Stamm auch bei unterschiedlichen Substraten unverändert, während 5 Stämme bei Änderung des pH-Wertes auf 5 gemischt wuchsen. Dagegen erfolgte auf Malzagar von pH 5 für diese rein rechtswendiges Wachstum und auf Malzagar von pH 7 wuchs nur ein Stamm gemischt. Insgesamt läßt sich sagen, daß der saure Bereich Rechtswendigkeit und der neutrale Linkswendigkeit fördert.

Von besonderem Interesse ist die Frage nach den Ursachen für das gekrümmte Wachstum der Kolonieausläufer. PRINGSHEIM (1918), GERSBACH (1922) sowie PRINGSHEIM u. LANGER (1924) prüften verschiedene Faktoren wie

Spannungen im Agar, Art der Beimpfung, Schwerkraftwirkung und Feuchtigkeitsgefälle, die sich aber für die Erklärung des Phänomens als bedeutungslos erwiesen. Auch eine Krümmung der Bakterien in der Art von Vibrionen schloß PRINGSHEIM (1918) aus. So vermuten die genannten Autoren Einflüsse als Ursache der Krümmungen, die in den Bakterien selbst liegen. PRINGSHEIM u. LANGER (1924) definieren dies genauer, indem sie eine physiologische oder physikalische dorsiventrale Polarisierung der radiären Fäden annehmen. Daß der Kontakt mit dem Substrat von Bedeutung ist, zeigen Stichbeimpfungen bis zum Petrischalenboden, wo sich ebenfalls spiraliges Koloniewachstum ausbildet, das bei Aufsicht auf die umgekehrte Platte ebenfalls linkswendig verläuft. Der Kontakt mit dem Glasboden ist also ohne Einfluß.
Bei HAWKER et al. (1962) findet sich lediglich der Hinweis, daß eine leicht "asymmetrische Teilung" des Bacillus mycoides zu langen verzweigten Zellketten führe, die sich nach rechts oder links abwenden.

Nach unseren Beobachtungen an lebenden Mikro- wie Makrokolonien sind unterschiedlich starke Krümmungen der Zellen selbst sowie ein meist nur geringfügiges Abknicken der Einzelzellen von Zellketten (siehe auch 5.6.1.1.1 sowie 5.6.2.1.1) als Ursache der gekrümmten Zellketten und damit auch der Zellstränge anzusehen. Daß bei dem untersuchten rechtswendigen Stamm auch Krümmungen und Abknickungen nach links erfolgen in scheinbar regelloser Folge, erklärt auch das Auftreten undeutlich ausgerichteter oder linkswendiger Stränge bzw. solcher, die in ihrem Verlauf die Krümmungsrichtung wechseln. Es reicht demnach die scheinbar zufällige Ausrichtung der einzelnen Krümmungen und Abknickungen nicht in jedem Fall aus, um durch Summierung der Einzelabweichungen die "stammspezifische" Krümmungsrichtung zu ergeben. Insgesamt sind aber an jeder Kolonie des untersuchten Stammes wie mancher anderer, über die berichtet wurde, so viele Stränge vorhanden, die eine eindeutige Zuordnung zu rechts- oder linkswendig ermöglichen, wobei auch beide Komponenten gleichstark vertreten sein können.

Die beobachteten Krümmungen der Zellen und Abknickungen sind besonders auf BPA, wo auch die Krümmung der Stränge insgesamt geringer ist als auf WgA, vielfach sehr geringfügig oder fehlen, so daß sie bei weniger intensiver Beobachtung leicht übersehen werden können. Da es sich um

Feststellungen handelt, die nur an einem Stamm getroffen wurden, sind zur Erhärtung dieser Befunde zweifelsohne weitere Überprüfungen an anderen Stämmen erforderlich.

Im Laufe unserer Untersuchungen konnten wir keine Anzeichen von Torsionen der Zellketten um die eigene Achse feststellen, wie sie von STAPP u. ZYCHA (1931) und KLUYVER u. VAN NIEL (1926) (bei der verwandten Art Bacillus funicularis) beschrieben werden und als wesentliche Ursache für die Wendigkeit der Kolonien von Bacillus mycoides angesehen wurden. Diese Annahme gründet sich allerdings auch auf Beobachtungen an Hängetropfenkulturen, die u.E. nicht unbedingt mit den Bedingungen auf festen Nährböden gleichgesetzt werden dürfen.

Offen bleibt weiterhin die Frage nach der relativen Konstanz der Krümmungsrichtung von Kolonieausläufern eines Stammes wenigstens unter gleichen Substratverhältnissen, wie die Befunde von v. KLOPOTEK (1969) nahelegen.

Möglicherweise erfolgt die Krümmung der Zellen auf genetischer Grundlage, wobei endogene Faktoren stark wirksam werden können.

Wenn man von der Annahme ausgeht, daß die Form von Stäbchenbakterien und damit auch von Bacillen im allgemeinen länglich-zylindrisch und gerade ist, stellen derartige Krümmungen, wie sie bei Bacillus mycoides beobachtet wurden, erhebliche Abweichungen von der Norm dar, die sonst nur unter Einfluß von schädigenden Substanzen auftreten. Allerdings sind bei der Musterung und Beobachtung einer Vielzahl von Mikrokolonien anderer Species der Gattung Bacillus unter sog. Standardbedingungen (BPA bei Zimmertemperatur) häufig von der linearen Ausrichtung abweichende Zellen vorhanden, ohne daß eine schädigende Wirkung bestimmter Stoffe erkennbar wäre oder mechanische Einflüsse wirksam werden. Letztere bedingen besonders an Zellen langer Zellketten z.B. in Schleifen-

form regelmäßige Krümmungen.

Gekrümmte Zellen als Arteigentümlichkeit sind neben Gattungen wie Vibrio, Desulfovibrio und Spirillum auch von dem Sporenbildner Clostridium nigrificans (STÜVEN 1960) bekannt, der wegen dieser Eigenart häufig zu anderen Gattungen gezählt wurde.

Nach der Ringtheorie der Mureinbiosynthese von PELZER (1967) wächst die Zellwand bzw. deren Stützmembran durch Einsetzen von Ringen, wobei der einzelne Ring eine jeweils gleiche Breite aufweist. Damit dürften theoretisch nur gerade Zellen entstehen können. Diese Theorie scheint vor allem auf gramnegativen Zellen zu basieren und wird durch die Beobachtung lebender wachsender Zellen gestützt, die mit fluoreszierenden Antikörpern behandelt wurden. Einige Formen zeigten danach nichtfluoreszierende ringförmige Wachstumszonen. Aber gerade bei Bacillus cereus und Bacillus megaterium erwähnen CHUNG et al. (1964) pr Zelle mehrere Wachstumszonen in unregelmäßiger Verteilung. Vielleicht kann letztere Anordnung das Entstehen von gekrümmten Zellen eher erklären als eine Anlagerung ringförmiger Zonen.

Damit bleiben vorerst die Ursachen für das Auftreten gekrümmter Zellen bei Bacillus mycoides, deren Wachstumsmechanismus und die unter gleichen Kulturbedingungen konstante Krümmungsrichtung der Mehrzahl der Hauptstränge einer Kolonie ungeklärt.

6.2.2 Makrokolonie-Entwicklung

Die Unterscheidung zwischen Mikro- und Makrokolonie in dem von uns ange wendeten Sinne ist hauptsächlich durch das Alter und die damit in Zusammenhang stehende Größenordnung der betreffenden Kolonien bedingt. Hierdurch werden für beide Kategorien unterschiedliche Untersuchungsmethode erforderlich, wobei aber betont sei, daß es sich letzlich um eine künstliche

und nach praktischen Gesichtspunkten erfolgende Einteilung handelt.

Das Charakteristikum der Makrokolonien ist ihre Sichtbarkeit für das unbewaffnete menschliche Auge, dem sie sich als mehr oder weniger von der radiärsymmetrischen runden Idealform, der z.B. die Gattung Micrococcus sehr nahe kommt, abweichend darbieten.

Der Vertikalschnitt durch das Zentrum einer Kolonie kann wegen deren etwa radiärsymmetrischen Form, die, abgesehen von anderen Einflüssen und endogenen Eigentümlichkeiten, am ehesten von solchen erreicht wird, welche gleichmäßig von mehreren Seiten ungehemmt oder gehemmt durch andere sind, als für die gesamte Kolonie annähernd verbindlich gelten. Wie nach der äußeren Erscheinung der untersuchten Kolonien zu erwarten war, ergaben sich für die einzelnen Species unter jeweils unterschiedlichen Kulturbedingungen (Nährboden, Temperatur) und dem Alter der Kolonien vielfältige Unterschiede bei deren Schnittbildern, die im einzelnen in Kapitel 5. Untersuchungsergebnisse dargestellt sind. Im folgenden soll versucht werden, Gemeinsamkeiten und Prinzipien, die den jeweiligen Kolonien und ihren Entwicklungsgängen zugrundeliegen, auch für den Makrokoloniebereich darzustellen.

6.2.2.1 1.Makrokoloniestadium

Mit Ausnahme des langsamwüchsigen Bacillus polymyxa wurde dieses Stadium im Alter von 1 bis 2 Tagen nach der Beimpfung im Schnitt untersucht. Nach HENRICI (1934) sowie WINKLER (1956) beginnt die Sporenbildung durchschnittlich mit der Beendigung der logarithmischen Wachstumsphase. Wieder mit Ausnahme von Bacillus polymyxa war entweder der Beginn von Versporung auf beiden verwendeten Nährböden an den Schnitten festzustellen bzw. wenn dies nicht möglich war, konnten Sporen oder versporende Zellen an Hand von Präparaten aus mit der Öse entnommenem Material derselben Schale, von der die Entnahme für die Schnitte stammt, vereinzelt erkannt werden. Dies erlaubt den Schluß, daß das Makrokolonie-

stadium im Alter von 1 bis 2 Tagen etwa der auslaufenden logarithmischen Wachstumsphase entspricht, für die eine konstante und maximale Wachstumsgeschwindigkeit angenommen wird und in deren Verlauf die Größe der Zellen gegenüber der Latenzphase bereits wieder deutlich abnimmt. Letztere Erscheinung wurde bereits in dem Kapitel Mikrokolonie-Entwicklung abgehandelt. Wenngleich in Abhängigkeit von Größe der Zellen, Kettenbildung und anderen Faktoren die flächenhafte Ausdehnung der Kolonien bei den einzelnen Formen unterschiedlich ist, erfolgte deutlich das stärkste Wachstum äußerlich sichtbar und ungefähr durch Flächenausdehnung und Höhe der lebenden Kolonien bestimmbar, eben innerhalb der ersten 2 Entwicklungstage, womit dieses Stadium als die eigentliche "Wachstumsphase" bestätigt wird.

Im 1. Makrokoloniestadium ergeben sich unter den einzelnen Formen noch die geringsten Abweichungen, und die Kolonien sind in sich selbst, die Feinstruktur betreffend, nicht oder nur andeutungsweise differenziert. Der Kolonieumriß im Schnitt entspricht weitgehend dem makroskopischen Bild. So zeigt für Glatt- und Rauhformen das Zentrum die höchste Erhebung und fällt zum Rand hin zunehmend ab. Entsprechend den Befunden an den Mikrokolonien sind die Glattformen Bacillus subtilis, cereus (Glatt-Variante) und polymyxa auf BPA sowie die stark abweichenden Kolonien von Bacillus mycoides bei + 37^{0} auf beiden Substraten am erhabensten und erscheinen im Schnitt etwa tellerartig gewölbt. Diesem Schema entspricht auch der anfangs etwa intermediär erscheinende und dann glatter werdende Bacillus pumilus. Das gegenüber dem Flächenwachstum betonte Höhenwachstum dieser Glattformen und denen ähnelnden Kolonien beruht auf denselben Ursachen, die auch für den Mikrobereich formgebend waren. Die fehlende Starrheit der Zellketten und -stränge bewirkt eine geringere Tendenz zur Ausbreitung, so daß in Zusammenhang mit der Reibung auf dem Substrat sich die dicken Zellstränge mit zunehmendem Wachstum gegenseitig behindern und empordrücken, wobei sie wellenförmig in vertikaler Ebene ineinandergeschoben werden. Diese wellig-ver-

tikale Struktur mit zentrifugaler Ausrichtung ist im Schnitt direkt zu erkennen.

Im Gegensatz hierzu stehen die flächigen Kolonien der ausgesprochenen Rauhformen wie Bacillus cereus und Bacillus mycoides unter Normalbedingungen mit betonter Ausbreitungstendenz und entsprechend gering ausgeprägtem Höhenwachstum. Wenngleich die Länge der Einzelzellen gegenüber dem Mikrokoloniestadium stark abgenommen hat, sind der Zusammenhalt der Zellen und die starre Ausrichtung der Ketten und Stränge geblieben, die den flächigen Charakter dieser Kolonien verursachen. Vom Zentrum aus nimmt die im Vergleich zu den Glattformen geringe Koloniehöhe bei Bacillus cereus zum Rande hin ganz allmählich und beinahe linear ab. Dagegen verläuft der Kolonieumriß von Bacillus mycoides unregelmäßig auf und ab infolge der gekrümmten Hauptstränge, die im zentralen Teil der Kolonie miteinander verbunden sind, während sie randwärts im Schnitt nach außen zunehmend einzeln liegen. Bei Bacillus cereus, andeutungsweise auch bei Bacillus mycoides, sind abwechselnde Längs- und Querschnitte dicker Zellstränge zu erkennen, die meist die gesamte Koloniehöhe ausfüllen, und dadurch zustandekommen, daß die Stränge, im Gegensatz zu den Glattkolonien, in horizontaler Ebene wellig verlaufen. Diese Anordnung wird durch die betont zentrifugale Ausbreitung der starren und langen Zellverbände bedingt, deren Eigenschaften kein ausgeprägtes Höhenwachstum ermöglichen, für das der wellenförmige Verlauf der Stränge in vertikaler Ebene charakteristisch ist.

Bereits als Mikrokolonien zeigten auf Weizengrießagar die sonst typischen Glattformen eine Tendenz zum rauhen Entwicklungsmodus. Auch für das 1. Makrokoloniestadium ergaben sich makroskopisch wie im Schnitt erhebliche Abweichungen von den Befunden auf BPA. Ausgeprägt rauh verhält sich lediglich Bacillus mycoides, während Bacillus cereus vergleichsweise zu den Befunden auf BPA stärker und erhabener wächst und wellige Strukturen in horizontaler und vertikaler Ebene zeigt, also eine Mischstruktur aufweist. Ein ähnlicher Aufbau findet sich bei Bacillus subtilis und pumilus.

Schon hier sei erwähnt, daß bei Berücksichtigung der weiteren Entwicklung im allgemeinen das Wachstum auf WgA vergleichsweise zu dem auf BPA geringer und weniger differenziert schien. Deshalb fiel es auf, gegenüber den sonst durchweg einheitlichen und einfachen welligen Strangstrukturen in horizontaler oder vertikaler Ebene bzw. in beiden Ebenen bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) und Bacillus mycoides (+ 37°) bereits in diesem frühen Stadium einen hohen Grad von Differenzierung (Dreischichtung und Versporung) anzutreffen, der für den Mangelnährboden aus dem sonst gewohnten Rahmen fällt. (Einzelheiten dieser Befunde werden erst in Zusammenhang mit der Bildung von Schichten besprochen).

Tiefenwachstum in das Substrat war lediglich für Bacillus mycoides festzustellen auf beiden Nährböden bei Zimmertemperatur sowie auf BPA bei + 37°, das jeweils von der Mitte der angeschnittenen Hauptstränge im Koloniezentrum bzw. bei erhöhter Bebrütungstemperatur unregelmäßig vom gesamten Koloniekörper ausging.

6.2.2.2 2. Makrokoloniestadium

Dieses Stadium umfaßt (mit Ausnahme von Bacillus polymyxa) den Entnahmebereich zwischen 5 und 10 Tagen, wobei 10 Tage alte Kolonien überwiegen. Wenngleich bei den vielschichtigen Vorgängen innerhalb jeder sich entwickelnden Bakterienkolonie nur eine ungefähre Zuordnung zu einer bestimmten Entwicklungsphase erfolgen kann, dürfte dieses Stadium der Ruhephase nach WINKLER (1956) entsprechen, die der logarithmischen Wachstumsphase folgt. Erstere ist gekennzeichnet durch Wachstums- und Absterbevorgänge, die sich noch etwa im Gleichgewicht befinden, als Folge der beginnenden Erschöpfung des Nährbodens und der zunehmenden Anhäufung hemmender und schädigender Stoffwechselprodukte. Wenngleich damit auch bereits das stärkste generelle Wachstum überschritten ist und sich der Beginn von Alterung und Abbau anzeigt,

wird man dieses Stadium, wenigstens für die von uns untersuchten Formen und unter Standardbedingungen, vor allem hinsichtlich der eingetretenen Differenzierungen im Aufbau und deren Erhaltungszustand als den "Höhepunkt" innerhalb der Kolonieentwicklung ansehen können.

Gegenüber dem vorstehend beschriebenen 1. Stadium haben sich makroskopisch an den Kolonien sowie im Schnitt wichtige Veränderungen ergeben, die sich vor allem ausdrücken durch

a) Volumenzunahme und Ausbreitung,
b) Differenzierungen in der Feinstruktur, Schichtenbildung, und
c) Auftreten atypischer Zellformen und Versporung zahlreicher Zellen.

Zu a). Soweit die Morphologie der Kolonien an Hand ihres Umrisses im Schnitt verfolgt werden kann, ist besonders bei Bacillus subtilis, cereus (Glatt-Variante), pumilus und mycoides (+ 37°), also den Glatt- und diesen ähnlichen Formen, auf BPA eine bemerkenswerte Zunahme an Höhe festzustellen. War im Alter von 1 bis 2 Tagen für diese der Kolonieumriß noch etwa einheitlich "tellerartig" gewölbt mit der höchsten Erhebung im Zentrum als Folge des dort einsetzenden Höhenwachstums, so ergibt sich nun ein stark davon abweichendes Bild.

Der zentrale Kolonieteil hebt sich, in der Höhe etwa gleichbleibend, heraus und entspricht in seinem Durchmesser mindestens der Ausdehnung des 1. Stadiums. Dieser Teil wird als "Koloniekörper" bezeichnet, weil er quantitativ dominiert. Da das Wachstum hauptsächlich zentrifugal erfolgt, treten in diesem vom Zentrum her die wichtigsten Differenzierungen auf, so daß sich der Koloniekörper auch qualitativ von dem übrigen Kolonieteil unterscheidet. Letzterer nimmt den Randbereich ein und stellt sich wegen des abnehmenden Wachstums im Schnitt flach und mehr oder weniger rasch abfallend dar. Er wird als "Zuwachsrand" bezeichnet, weil das weitere Wachstum überwiegend in diesem und deutlich vom Koloniekörper abgesetzt erfolgt. Auch makroskopisch hebt sich der Zuwachsrand meist flach und

durchscheinend von dem erhabeneren und dichteren, deshalb fast immer opaken, Koloniekörper ab. SCHARIKOWA et al. (1966) bezeichnen den flachen Rand älterer Kolonien von Bacillus brevis als "Sekundärwachstum". Wir lehnen diesen Terminus ab, der leicht zu Verwechslungen mit gänzlich andersartigen Erscheinungen wie sekundärem Wachstum auf bzw. in älteren Kolonien Anlaß geben kann.

Wenn auch der Koloniekörper als in seiner Höhe etwa gleichbleibend genannt wurde, waren im Detail davon teilweise gewisse Abweichungen zu erkennen. So zeigt das Schnittprofil bei Bacillus subtilis, cereus (Glatt-Variante) und mycoides (+ 37^{O}) auf BPA eine zentrale, flach knopfartige Erhebung, von der nach außen gesehen eine geringe Abnahme an Höhe und im Übergang zum Zuwachsrand erneut eine Zunahme erfolgt. Makroskopisch stellt sich dies als flache Vertiefung bzw. wulstige Erhebung in Form konzentrischer Ringe dar.

Koloniewachstum mit "konzentrischen Ringen", die bedeutend ausgeprägter und zahlreicher sein können als bei den hier genannten Formen, ist von den verschiedensten Bakterien und anderen Mikroorganismen bekannt (LIESKE 1921), ohne daß bisher dafür eine befriedigende Erklärung gefunden wurde. Möglicherweise liegen dieser Erscheinung bei den einzelnen Keimen nicht immer gleiche Ursachen zugrunde, für die vor allem "erbliche" (endogene) Faktoren vermutet werden (LIESKE), wenngleich auch der periodische Wechsel von Umweltbedingungen in Erwägung gezogen wurde (z.B. HUTCHINSON 1907).

Der Einfluß von Licht und Temperatur ist für die Erklärung der von uns beschriebenen Erscheinungen wohl auszuschließen, wenngleich die Kulturen bei "Zimmertemperatur" im Laufe des Tages unterschiedlichen Temperaturen und Lichtverhältnissen ausgesetzt sind. Deren Rhythmik läßt aber keinen Zusammenhang mit diesen Erscheinungen erkennen, die in gleicher Weise auch bei Bacillus mycoides auftraten, der unter weitgehend konstanten Bedingungen im Brutschrank gehalten wurde.

Wenn als Ursache für abwechselnd erhabenere und niedrigere Kolonieteile die bereits erwähnten Umwelteinflüsse in Erwägung gezogen wurden, so

bedeutet dies die fälschlich verallgemeinernde Annahme, daß sich nämlich wechselnde Wachstumsintensität immer als unterschiedlich starkes Höhenwachstum ausdrücken müsse. Aber an Hand unserer Kolonieschnitte ist für die untersuchten Formen zu erkennen, daß die jeweilige Höhe eines Kolonieteiles auch abhängt von der Größe der Bauelemente, deren Form, der Art ihres Zusammenhaltes und der Starrheit von Zellverbänden sowie der Reibung auf dem Substrat und den aus diesen morphologischen und mechanischen Gegebenheiten resultierenden zentrifugal und zentripetal wirksam werdenden Kräften. So kann die unterschiedliche Höhe der Kolonie auch durch Änderungen der Länge und Form seiner Bauelemente bedingt sein, wie sie sich innerhalb der verschiedenen Wachstumsphasen bzw. durch den Einfluß von Stoffwechselprodukten ergibt, ohne daß es sich allein um zunehmendes oder abnehmendes Wachstum handeln muß. Diese Überlegungen werden gestützt durch Befunde von COMBES et al. (1957) an Kolonien von Nocardia ivorensis. Die älteren Kolonien dieser Species zeigten neben einer zentralen Erhebung mehrere konzentrische, ringartige Peripherieerhebungen aus überwiegend kokkoiden Bauelementen, während die dazwischenliegenden flacheren Teile aus homogenem Filamentmycel bestanden.

Für die genannten wulstartigen Erhebungen im Übergang von Koloniekörper zu Zuwachsrand waren im Schnitt stark in vertikaler Ebene wellig angeordnete Zellstränge zu erkennen, die Wirbelbildungen und Aufwölbungen über die basalen Kolonieteile zeigten, so daß eine Ausbreitungshemmung in zentrifugaler Richtung zu vermuten ist, die möglicherweise in Zusammenhang steht mit der im Zuwachsbereich stark abnehmenden Wachstumsintensität. Auch fällt auf, daß der Beginn des Tiefenwachstums bei Bacillus subtilis und mycoides (+ 37^{0}) auf BPA und Bacillus subtilis auf WgA ebenfalls von der Basis dieses aufgewölbten Übergangsbereiches Koloniekörper-Zuwachsrand ausgeht.

Im Gegensatz zu den vorstehend besprochenen Befunden sind die Kolonien und deren Umrisse im Schnitt von den Rauhformen Bacillus cereus und

mycoides einfach gestaltet und haben sich gegenüber dem 1. Stadium nur unbedeutend quantitativ an Höhe und Durchmesser verändert. Der Unterschied zwischen Koloniekörper und Zuwachsrand ist dementsprechend wenig ausgeprägt. Besonders fällt bei Bacillus mycoides für beide Substrate eine starke Ausbreitung des Tiefenwachstums auf.

Zu b) und c). Wenn im vorangegangenen Abschnitt vor allem das Verhältnis von äußerem Erscheinungsbild und Kolonieumriß im Schnitt und deren Abhängigkeit von Höhe und Durchmesser interessierten, sollen nun Besonderheiten des inneren Baues näher betrachtet werden. Dabei wird die Sporenbildung nur gestreift und eingehender erst unter 6.3 behandelt.

Entsprechend den Befunden über die äußeren Merkmale erwiesen sich im Aufbau als am einfachsten die rauhen Kolonien von Bacillus cereus und mycoides auf BPA und WgA sowie die diesen ähnlichen von Bacillus subtilis und pumilus auf WgA. Auch einige der unter Antibiotikumeinfluß gewachsenen Kolonien, die im Alter von 15 Tagen etwa mit diesem Stadium vergleichbar sind, lassen sich nach ihrem Aufbau hierzu rechnen (Bacillus pumilus auf BPA + 5 I.E. Penicillin/ml und Bacillus mycoides auf BPA + 1 I.E. Penicillin/ml). Beim Vergleich mit der erhabenen und glatt wachsenden übrigen Formen fehlt den vorgenannten jegliche Schichtung des Kolonieaufbaues oder deren Andeutung. Die Kolonien sind, ähnlich dem im allgemeinen undifferenzierten 1. Stadium, aus dicken Strängen aufgebaut, die in horizontaler, bisweilen auch in vertikaler Ebene, in Wellenzügen verlaufen, oder es ist bereits ein weitgehender Zerfall der primären Strukturen eingetreten. In letzterem Fall dominieren neben Sporen, zerfallenen Zellen und Schleim vor allem atypische Zellen, die besonders auf WgA häufig sind.

Sporenbildung erfolgt hauptsächlich im Koloniekörper und geht von dort mit zunehmendem Alter auch auf den Zuwachsrand mehr oder weniger weit über.

Wurde für dieses Entwicklungsstadium der Begriff des "Höhepunktes" auch hinsichtlich der Differenzierungen in der Feinstruktur verwendet, so gilt das vor allem für die glatten und denen ähnlichen Kolonieformen mit ausgeprägtem Höhenwachstum und Schichtenbildung.

Ein geschichteter Kolonieaufbau wurde an Hand von Schnitten für zahlreiche Bakterienspecies beschrieben (MASSINI 1907; HUTCHINSON 1907; STÖSS 1955; HENNEBERG 1957). Dabei handelt es sich um eine vertikale Anordnung voneinander durch Struktur und Zusammenhalt bzw. Form, Größe, Anfärbbarkeit oder Erhaltungszustand der Bauelemente mehr oder weniger deutlich voneinander abgesetzte und in sich etwa gleichartige Zell-Lagen, die am ausgeprägtesten im Koloniezentrum sind und meist nicht bis zum Kolonierand reichen. Die Schichten verlaufen bei einem einfachen Aufbau etwa parallel zur Nährbodenoberfläche und der unteren Koloniebegrenzung, während sie bei komplizierterer Oberflächengestaltung der Kolonie dieser folgen (LEGROUX u. MAGROU 1920; STUNKAT 1961).

Die Anzahl der Schichten innerhalb einer Kolonie ist im allgemeinen gering, und es sind vor allem Zwei- und Dreischichtungen beschrieben worden (STÖSS), die allerdings in sich wieder untergliedert sein können. Es scheint bei den Kolonien von Enterobacteriaceen und Bacillen Schichtenbildung besonders ausgeprägt vorzukommen (STÖSS; HENNEBERG; STUNKAT).

Über die Ursachen für einen geschichteten Kolonieaufbau finden sich nur vereinzelt Angaben. Indirekt macht HUTCHINSON das Absterben der Zellen in Zusammenhang mit ihrem Alter dafür verantwortlich ebenso wie den Einfluß von Stoffwechselprodukten, Nährstoff- und Sauerstoffmangel. STÖSS äußert die Vermutung, daß die Fermente der Bakterien "einen direkt auf die Lagerung, Färbbarkeit und Gestalt der Keime einwirkenden Säfte- und Diffusionsstrom hervorrufen, mit dem sich die senkrechte Lagerung der Keime in der Mittelschicht vieler Kolonien und das Abblassen der Bakterien in der unteren Mittelschicht gut erklären ließ". Auch LEWICKI (1958) sieht in den sog. "Farbschichtungen", also unterschiedlicher Anfärbbarkeit des oberen und unteren Kolonieteiles bei Mycobacterien, Auswirkungen gewisser Diffusionsunterschiede.

Bei Bacillus polymyxa auf BPA ist bereits für das 1. Stadium im Alter von 5 Tagen eine Zweischichtung zu erkennen, die aber weniger auf Struktureigentümlichkeiten als auf der Dichte der Lagerung und unterschiedlicher Anfärbbarkeit beruht. Deutlicher bleibt diese bis zur letzten Entnahme nach 35 Tagen erhalten und ähnelt der von LEWICKI beschriebenen Farbschichtung. Wohl auf Grund des langsameren Wachstums weicht diese Species von den anderen in zahlreichen Eigenschaften ab und läßt auch im

Schnitt auf BPA jegliche weitere Differenzierung sowie im Umriß einen abgesetzten Zuwachsrand vermissen. Es ist wahrscheinlich, daß für den Entwicklungsverlauf der Kolonien der hier eigentlich von den Bauelementen her der Glattform entsprechen müßte, auch die Folge der Zellteilungen und damit der Zeitfaktor von Bedeutung ist. Die langsamere Teilung ermöglicht demnach ein stärkeres Flächenwachstum, weil die Spannungen und Kräfte innerhalb der Zellstränge, die für ein Höhenwachstum und die vertikale Wellung in Verbindung mit dem Widerstand des Substrates erforderlich sind, hier nach außen weitgehend abgeführt werden können.

Den vorgenannten ähnliche Zweischichtungen sind auf BPA für Bacillus subtilis und pumilus bereits im Alter von 1 Tag zu erkennen, für ersteren sogar die Anfänge einer dritten und senkrecht orientierten Schicht. Wenn STÖSS (1955) schon nach 24 Stunden deutliche Dreischichtungen und Versporung für die Kolonien dieser Species beschreibt, ist das durch die Bebrütung bei + 37° bedingt, während unsere Kulturen mit Ausnahme von Bacillus mycoides nur bei Zimmertemperatur kultiviert wurden.

Dreischichtung mit zellulären Differenzierungen und Versporung wurde, wie schon angeführt, vom Schema abweichend bereits nach 2 Tagen auf WgA von Bacillus cereus (Glatt-Variante) und Bacillus mycoides bei + 37° erreicht. Dagegen entsteht diese bei Bacillus subtilis, pumilus und cereus (Glatt-Variante) auf BPA und Bacillus polymyxa auf WgA später und ist im Alter von 10 Tagen voll ausgebildet. Eine Ausnahme stellt lediglich Bacillus mycoides auf BPA bei + 37° dar, dessen Kolonien zwar erhaben und glattähnlich wachsen, aber wohl als Folge der aberranten und unregelmäßigen Zellen bei der erhöhten Temperatur einen eindeutigen Schichtenaufbau vermissen lassen.

Die Schichtung ist stets auf den erhabenen Koloniekörper beschränkt, was auf deren Zusammenhang mit dem Höhenwachstum hinweist. Schematisch lassen sich primär drei Schichten unterscheiden, die in der Reihenfolge

von unten beginnend als "Basal-", "Mittel-" und "Deckschicht" bezeichnet werden. Die Höhe der Schichten ist für die einzelnen Species unterschiedlich und hängt auch von äußeren Faktoren ab. Im allgemeinen besitzt aber die Mittelschicht die größte Höhenausdehnung, während Basal- und Deckschicht flacher ausgebildet sind.

Die Basalschicht besteht meist aus Zellen, die schlanker sind als die der folgenden Schicht, zu einer dichten Lagerung neigen und oft erste Alterungserscheinungen zeigen. Entweder liegen sie im Schnitt ungeordnet oder lassen Andeutungen einer horizontalen Ausrichtung erkennen, falls sie längs getroffen sind. Wenn HUTCHINSON (1907) und STÖSS (1955) den horizontalen Verlauf dieser wie auch der Deckschicht betonen, so handelt es sich dabei stets um Kolonien, die in ihrer Entwicklung zwischen dem von uns untersuchten 1. und 2. Stadium stehen.
Sporulation fehlt anfangs immer und wurde nur bei Bacillus subtilis auf BPA in dicklichen Zellen des untersten Bereiches häufiger festgestellt. Bei Bacillus subtilis waren in der Basal- wie den beiden anderen Schichten verschiedentlich sog. "säurefeste Stäbchen" vorhanden, die in ihrer Gestalt der Norm entsprachen, aber mit der Sporenfärbung kräftig rot angefärbt wurden. In Quer- und Schrägschnitten sind diese leicht irrtümlich als Sporen anzusprechen.

Die Mittelschicht ist durch Form und Ausrichtung ihrer Bauelemente deutlich von den anderen Schichten unterschieden und löst sich infolge Vorbehandlung leicht von der Basalschicht ab. Die normalen Zellen besitzen bei größerem Durchmesser meist längliche Gestalt und sind zu Ketten oder Strängen verbunden, die mehr oder weniger linear und aufrecht und zur Deckschicht hin gewölbeartig gekrümmt verlaufen. Diese Anordnung ist besonders deutlich bei Bacillus pumilus auf BPA und Bacillus polymyxa auf WgA ausgebildet und findet sich als Teil einer Dreischichtung auch bei dem sonst rauh wachsenden Bacillus cereus unter dem Einfluß von Antibiotika, die betont glatte Kolonien bewirken.

Eine derartige Strukturierung der Mittelschicht wird erstmalig für Bacillus subtilis durch HUTCHINSON (1907) beschrieben und von STÖSS (1955) bestätigt, der diese auch für Bacillus mesentericus (syn. pumilus) und verschiedene Enterobacteriaceen nachweist. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei der mehr oder weniger aufrechten, wellig-faltigen Stranganordnung in Kolonien von Mycobacterium phlei nach STÖSS (1955) und Mycobacterium tuberculosis (Typ humanus und bovis) nach LEWICKI (1958) um den vorgenannten homologe Erscheinungen handelt, die hier allerdings nicht immer an eine bestimmte Schichtung gebunden sind, stellt diese wahrscheinlich ein allgemein verbreitetes Strukturprinzip ausgeprägt erhabener Kolonien von stäbchenförmigen Bakterien auch unterschiedlicher Verwandtschaftsgruppen dar.

Für die genannten Formen weist die Mittelschicht zugleich die stärkste Versporung auf und enthält gehäuft atypische Zellen, die sich in diesem Stadium stark anfärben lassen und durch Form und Größe von den normalen vegetativen Zellen unterschieden sind. Es dominieren rundlich-ovale Formen, die auch gekrümmt sein können. Besonders häufig treten atypische Zellen bei Bacillus subtilis (BPA) schon im Alter von 5 Tagen auf vor allem im unteren Teil der Schicht, um im Alter von 10 Tagen fast deren untere Hälfte einzunehmen, während die Sporen gehäuft in der oberen Hälfte liegen. Wohl als Extremfall unter dem hier schädigend wirkenden Einfluß der erhöhten Bebrütungstemperatur von + 37^{O} in Verbindung mit dem Mangelnährboden besteht bei Bacillus mycoides die Kolonie unter diesen Bedingungen bereits nach 2 Tagen fast nur aus atypischen Zellen bei sehr geringer Versporung.

Die Deckschicht mit ihrer meist geringen Höhe ähnelt auch insofern der Basalschicht, als die Zellen oft ebenfalls einen geringeren Durchmesser haben gegenüber denen der Mittelschicht und dichter gelagert sind. Aber sie ist von der Mittelschicht weniger abgesetzt und läßt von der Entstehung her einen deutlichen Zusammenhang mit dieser annehmen. Die sonst

scheinbar unregelmäßige Lagerung der Zellen zeigt bisweilen bei Längsschnitten Andeutungen einer horizontalen Ausrichtung, z.B. für Bacillus pumilus auf BPA, und bestätigt damit die Befunde von STÖSS (1955) an jüngeren Kolonien. Wohl als Anzeichen beginnender Alterung sind die Einzelzellen dieser Schicht gegenüber der darunterliegenden meist entweder nur schwach anfärbbar, oder durch eine Komprimierung der Zellen stellt sich die Schicht stärker angefärbt dar. Vereinzelt kommen in dieser auch Sporen vor.

Diesen drei "primären" Schichten läßt sich als "sekundäre" Bildung die sog. "komprimierte Zerfallsschicht" gegenüberstellen. Zerfallsschichten erwähnt auch STÖSS (1935) für den mittleren Teil von Kolonien gramnegativer Bakterien, Staphylococcus aureus und Pilzen (z.B. Torula spec.). Eine komprimierte Zerfallsschicht war bei den untersuchten Species nur für Bacillus cereus an den erhabenen und glattwachsenden Kolonien unter Antibiotika-Einfluß sowie für die Glatt-Variante auf BPA festzustellen. Stets befindet sich diese zwischen der Basal- und Mittelschicht und geht aus frühzeitig absterbenden und unter Schleimbildung zerfallenden Zellen vermutlich beider Schichten hervor. Die Schicht ist in sich sehr dicht, und vorhandene Zellreste sind immer deutlich horizontal ausgerichtet, so daß durch die darüberliegenden Kolonieteile und deren Höhenwachstum ein beträchtlicher Druck ausgeübt zu werden scheint. Während sonst in der komprimierten Zerfallsschicht kaum Sporen festgestellt werden konnten, fanden sich diese bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) auf BPA im Alter von 30 Tagen häufig in deren mittelstem Teil. Hier zeigte die Zerfallsschicht als zusätzliche Differenzierung eine dreifache Untergliederung, die vermutlich durch starkes Sekundärwachstum und damit Zerfall und Zusammendrücken der ehemaligen Mittelschicht nach unten bedingt ist.

Für die Entstehung des geschichteten Kolonieaufbaues ergeben sich aus den Schnittbildern des 1. und 2. Stadiums der Makrokolonieentwicklung folgende Feststellungen:

Der Beginn von Differenzierungen im Kolonieaufbau aus anfangs einheitlichen Strangstrukturen ist frühestens nach 1 Tag als Zweischichtung oder angedeutete Dreischichtung zu erkennen, wobei die basale Schicht bei der weiteren Entwicklung ein deutliches Zurückbleiben gegenüber dem oberen und quantitativ dominierenden Teil der Kolonie zeigt. Für die Zellen der basalen Schicht ist eine geringere Wachstumsaktivität anzunehmen, die durch frühzeitige Alterung bedingt zu sein scheint. Diese Alterung ist im Extremfall von Bacillus pumilus im Zweischichtenstadium schon äußerlich zu erkennen als unregelmäßige Lagerung meist einzelner Zellen von geringer Anfärbbarkeit, während die dichte obere Schicht aus stark anfärbbaren, dicken Zellsträngen besteht. Meistens erscheinen allerdings die basalen Kolonieteile, wohl als sekundäre Erscheinung, dichter gelagert und sind dann umgekehrt stärker anfärbbar.

Das weitere Koloniewachstum nebst Differenzierung vollzieht sich deutlich erkennbar bevorzugt über dem basalen Bereich. Es handelt sich bei der frühzeitigen Differenzierung der Kolonie in einen weitgehend inaktiven basalen Teil und in einen äußerst teilungsaktiven oberen und quantitativ dominierenden Teil um eine Erscheinung von grundlegender Bedeutung für das Zustandekommen des gleichmäßig geschichteten Kolonieaufbaues deren Ursachen allerdings bislang nicht zu erkennen sind. Da weiterhin über der basalen Schicht starkes Wachstum erfolgt und die Zellen durch Diffusion über diese Schicht Nährstoffe aus dem Substrat beziehen, dürften die Faktoren Nährstoffmangel oder schädigender Einfluß von Stoffwechselprodukten kaum als Ursache für die frühzeitige Alterung in Frage kommen. Eher könnte eine möglicherweise geringere Sauerstoffspannung in diesem Bereich für betont aerobe Formen von Einfluß sein, wobei unterschiedliche Ansprüche der einzelnen Formen an die Sauerstoffversorgung die beobachteten Unterschiede in der quantitativen Ausbildung der basalen Schicht und der Alterung der Zellen erklären würde. Eine geringere Versorgung mit Sauerstoff für Koloniebasis und -mitte vermutete schon HUTCHINSON (1907) als Ursache für die frühzeitige Entstehung von "Involutionsformen" und fehlende Sporenbildung in diesen Kolonieteilen.

Die hohe Teilungsfrequenz der Zellen des aktiven oberen Koloniebereiches bewirkt einen wellenförmigen Verlauf der Zellstränge in überwiegend vertikaler Ebene und damit eine ausgeprägte Ausdehnung in die Höhe. Hierbei werden die Wellenzüge der Zellstränge zusammengeschoben und ineinandergeschachtelt, so daß sie im Koloniezentrum mit der geringsten zentrifugalen Ausbreitungsmöglichkeit mehr oder weniger aufrecht und parallel zueinander verlaufen und im obersten Teil bogig oder gewölbeartig miteinander verbunden sind. Dort führt die Möglichkeit, dem Binnendruck in der Kolonie nach oben auszuweichen, zu einer zunehmend schichtartigen Abgliederung von Zellen. Diese bleibt, mit Ausnahme sehr früh eintretender Schichtung (z. B. für die Glatt-Variante von Bacillus cereus auf WgA) quantitativ gering durch den Mangel an Nährstoffen mit zunehmender Entfernung der Zellen vom Substrat neben einer allgemeinen Verarmung des Substrates. Damit ist die Ausbildung der primären Schichtung beendet, die wir als Basal-, Mittel- und Deckschicht bezeichnet haben. Aus dieser Entstehungsweise erklärt sich auch die relativ enge Verbindung der beiden Schichten, die zwischen der Basal- und der Mittelschicht fehlt. Deshalb vermögen schädigende Einflüsse während der Vorbehandlung und Einbettung der Kolonien letztere Schichten leicht voneinander zu lösen.

Als "sekundäre" Bildung kann durch gleichmäßigen und gehäuften Zerfall in Verbindung mit dem Druck der darüberliegenden Kolonieteile zwischen Basal- und Mittelschicht eine "komprimierte Zerfallsschicht" entstehen. Zusammenfassend sehen wir demnach die Ausbildung eines geschichteten Kolonieaufbaues an als das Resultat des Zusammenwirkens von

a) spezifischen Eigenarten der Zellen und Zellverbände,

b) physikalischen Faktoren (Substratwiderstand, gegenseitige mechanische Hemmung der Zellen an der zentrifugalen Ausbreitung bei hoher Wachstumsintensität, Binnendruck im Koloniegefüge mit Maximum im Zentrum) und

c) physiologischen Faktoren (Differenzierung in vertikal angeordnete Kolonieteile unterschiedlicher Wachstumsintensität und Alterung, vertikales Konzentrationsgefälle innerhalb von Kolonie und Substrat, Einfluß von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten auf das Wachstum und die Gestalt der Zellen).

Wir stimmen deshalb STÖSS (1955) nicht zu, der vermutet, daß ein durch Fermente bedingter Säfte- und Diffusionsstrom die charakteristischen Strukturen der Mittelschicht zu erklären vermag.

Der Übergang zwischen dem geschichteten Koloniekörper und dem Zuwachsrand erfolgt für die einzelnen Formen auf prinzipiell gleiche Weise. Die wichtigste Ursache für die Abnahme der Koloniehöhe im Randbereich liegt in dem einseitigen Fehlen der Ausbreitungshemmung durch benachbarte Zellen und damit in der Möglichkeit zur überwiegend zentrifugalen Ausbreitung an Stelle von Höhenwachstum. Nach der Ausbildung des Schichtenaufbaues erfolgt zusätzlich durch Erschöpfung des Nährbodens eine allgemeine Abnahme des Koloniewachstums, die allerdings in den äußeren Bereichen relativ am geringsten ist. Die bisherige Mittelschicht vereinigt sich in dem Übergangsbereich ohne Abgliederung einer Deckschicht mit der bisherigen Basalschicht zu einem einheitlichen Verlauf von Zellsträngen in mehr oder weniger ausgeprägten Wellenzügen unter allmählicher Höhenabnahme, die für den Zuwachsrand charakteristisch ist.

Tiefenwachstum kommt von den Formen mit geschichtetem Kolonieaufbau nur vor bei Bacillus subtilis auf BPA und WgA, Bacillus subtilis und cereus unter Chloramphenicoleinfluß sowie Bacillus mycoides (+ 37^{o}) auf BPA, wobei für letzteren trotz glatter Kolonieform ein Schichtenaufbau fehlt oder im Turnus der Entnahmen nicht festgestellt werden konnte.

Im Gegensatz zu Sekundärwachstum innerhalb der Kolonie, wie es für das folgende Stadium verschiedentlich festzustellen war, zeigt im Rahmen dieser Untersuchungen allein Bacillus mycoides bei + 37^{o} auf WgA auch makroskopisch auffällige und der Kolonieoberfläche aufsitzende Sekundärkolonien.

6.2.2.3 3. Makrokoloniestadium

Als 3. und letztes Stadium der Makrokolonieentwicklung betrachten wir den Entnahmebereich mit einem Koloniealter von durchschnittlich 20 bis 30 Tagen. In diesem dominieren neben nur geringem Wachstum im äußersten Zuwachsrand und in Form von Sekundärwachstum vor allem Alterungs- und Absterbevorgänge, so daß es im Entwicklungsschema einer Bakterienkultur der Absterbephase nach HENRICI (1934) und WINKLER (1956) zugeordnet werden kann. Der letzte Teil dieser Phase erstreckt sich u. U. über einen sehr langen Zeitraum, und wenn das Medium nicht austrocknet, bleiben einige wenige Überlebende fast unbegrenzt lange vorhanden (THIMANN 1964) Mit dieser Feststellung bezieht sich der Autor wohl auf Bakterien allgemein. Vergleichsweise zu anderen untersuchten Bakterien stellte STÖSS (1955) gerade für Bacillen die stärksten Zerfallserscheinungen fest. Auch die von uns untersuchten Formen wiesen auf BPA im allgemeinen nach 20 bis 30 Tagen starke Alterung und den Zerfall der meisten vegetativen Zellen auf, wobei allerdings für morphologisch noch intakt erscheinende Zellen nicht sicher entschieden werden kann, ob diese bei der Übertragung auf frischen Nährboden teilungs und vermehrungsfähig gewesen wären. Noch beschleunigter traten Versporung, Alterung und Zerfall ein auf dem Mangelnährboden Weizengrießagar, so daß hinsichtlich eines insgesamt relativ frühen und starken Zerfalls die Befunde von STÖSS (1955) bestätigt wurden. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich in dem Vermögen der Sporenbildung zu suchen gegenüber der Mehrzahl der nicht sporenbildenden Bakterien. Für die Bacillen ist die längere Erhaltung vegetativer, nicht sporulierender Zellen möglicherweise ohne Wert, und deren frühes Absterben könnte, wenn die Sporen einen Vorteil für die Erhaltung dieser Organismen darstellen, sogar eine positive Selektion bedeuten.

Wird Alterung als übergeordneter und umfassender Begriff angesehen, so ergeben sich im Rahmen dieser Untersuchungen für das 3. Makrokolonie-

stadium an detaillierten Veränderungen im Feinbau:

a) undeutliche Umrisse der Zellen und deren ungleichmäßige Anfärbung,

b) zunehmendes Auftreten atypischer Zellformen aus primären vegetativen Zellen,

c) weitgehender Zerfall der vegetativen und Reste der versporten Zellen zu "Detritus" und schleimigen Substanzen, Auftreten komprimierter Zerfallsschichten,

d) Undeutlichwerden und schließlich Schwinden spezifischer Strukturen und Schichtungen,

e) Auftreten von Sekundärwachstum in bzw. auf der Kolonie und

f) Verringerung der Höhe, "Zusammenfallen", vor allem des Koloniekörpers und damit des Unterschiedes zwischen diesem und dem Zuwachsrand.

Bereits erwähnt wurden Bacillus cereus (Glatt-Variante) bei Zimmertemperatur und Bacillus mycoides bei + 37° auf Weizengrießagar, die abweichend von dem entworfenen Entwicklungsschema bereits im Alter von 2 Tagen eine Dreischichtung und Versporung aufweisen. Die Formen zeigen dementsprechend auch frühzeitige Alterung und sind im Alter von 10 Tagen bereits weitgehend einheitlich versport bzw. im vegetativen Bereich zerfallen und lassen eine Schichtung nicht mehr erkennen. Die Abhängigkeit des Erhaltungszustandes der Strukturen vom Grad der Versporung demonstrierte dabei in auffälliger Weise Bacillus cereus. Im Schnitt war neben dem normalen ein praktisch unversporter Teil von der Art eines Sektors getroffen, der nach 10 Tagen zwar ebenfalls stark gealtert war, aber noch deutlich Strangstrukturen und die Dreischichtung erkennen ließ.

Es fiel auf, daß bei Bacillus mycoides unter den genannten Bedingungen überwiegend atypische Zellen vorkommen, die in Form und Anfärbung stark von der Norm abweichen. Aber auch bei Zimmertemperatur verhielt sich diese Species auf WgA abweichend, denn nach 10 Tagen bestand der Schnitt ebenfalls fast nur aus atypischen Zellen verschiedenster Form, die allerdings scharfe Konturen aufwiesen und bei der Entnahme nach 30

Tagen versport oder zerfallen waren. Diese Befunde demonstrieren besonders deutlich den Unterschied zwischen Mangel- und Standard-Nährboden, wobei ersterer vielfach neben geringerem Wachstum, Änderungen in der Kolonieform und frühzeitiger Versporung auch atypische Zellen und deren rasche Alterung hervorruft. Überhaupt scheinen die atypischen Zellen unabhängig von dem Substrat, auf dem sie entstanden sind, sowie von Form und sonstigen Eigenschaften rascher zu altern und zu zerfallen als normale vegetative Zellen.

Von den Glattformen auf BPA mit zusätzlichen Entnahmen im Alter von 20 Tagen begann bei Bacillus subtilis und pumilus bereits der Zerfall der Strukturen, aber die Schichtung war noch andeutungsweise zu erkennen. Um so deutlicher trat in diesem Stadium das Sekundärwachstum diffus wie in Form meist scharf umgrenzter, kompakter Sekundärkolonien in Erscheinung. Letztere liegen in der Kolonie oder wölben höchstens deren Oberfläche gering auf. Auch bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) ist nach 20 Tagen stark diffuses Sekundärwachstum anzutreffen, das aber nicht immer von guterhaltenen primären Zellen zu unterscheiden ist, während Sekundärkolonien erst nach 30 Tagen vorkommen, wobei die ursprüngliche Schichtung noch relativ gut erhalten ist.

Für Bacillus subtilis und pumilus sind dagegen im Alter von 30 Tagen keine primären Strukturen mehr zu erkennen. Lediglich bei Bacillus pumilus ist der Bereich der ehemaligen Deckschicht unter starker Verschleimung auffällig verdichtet, und bei beiden Keimen erfüllen vor allem Sporen die zusammengefallene Kolonie. Das Sekundärwachstum zeigt seinerseits vom Zentrum her deutliche Alterung. Völlig aus dem Rahmen des Bekannten fallen kompakte Sekundärkolonien im Tiefenwachstum von Bacillus subtilis, das sich stark ausgebreitet hat.

Bacillus polymyxa auf BPA hat in diesem Stadium nur im Koloniezentrum undeutliche Strukturen, und im kaum abgesetzten Zuwachsbereich ist für den Aufbau aus dicken Zellsträngen in abwechselnden Längs- und Quer-

schnitten keinerlei Alterung festzustellen. Dagegen sind auf WgA nur die äußeren Konturen der sehr erhabenen Kolonie wegen des hohen Schleimanteiles gut erhalten, aber die Struktur ist praktisch aufgelöst. Nur am Rand sind Andeutungen von Zellsträngen neben einzelnen Sporen vorhanden, und der dünne äußerste Zuwachs besteht noch aus gut anfärbbaren, schlanken Zellen.

Die Kolonien der Rauhformen Bacillus cereus und mycoides sind auf BPA und für ersteren auch auf WgA bei reicher Versporung auffällig gut erhalten. Dagegen lassen Bacillus subtilis und pumilus mit rauhähnlichen Kolonien auf WgA keine Strukturen mehr erkennen.

6.2.2.4 Tiefenwachstum

Neben Bakterienkolonien, die sich entweder nur auf der Oberfläche eines Substrates oder aus einer Schüttelkultur allseits vom Substrat umgeben als "Tiefenkolonien" entwickeln, zeigen andere von einem oberflächig gelegenen Kolonieteil ausgehendes Wachstum in das Substrat hinein. Wir bezeichnen diese Erscheinung in Anlehnung an BARTMANN u. HÖPKEN (1963) sowie FETTING (1957) als "Tiefenwachstum", da uns dieser Terminus als Gegensatz zu "Oberflächenwachstum" auf dem Substrat geeignet erscheint.

Tiefenwachstum konnten wir in unterschiedlicher Ausprägung an Kolonien mehrerer Species feststellen. Im Rahmen der Diskussion wurde dieses bislang nur beiläufig erwähnt, stellt aber dort, wo es auftritt, einen modifizierten Teil der Gesamtkolonie dar, so daß eine nähere Betrachtung notwendig ist.

Von Oberflächenkolonien ausgehendes Wachstum in das Substrat ist für Bakterien und Pilze verbreitet und wurde von den einzelnen Autoren unterschiedlich benannt ("Festwurzeln" oder "Einfressen", "Wurzelsystem", "Mycel" bei HUTCHINSON (1907); "wurzelförmige Fortsätze", "Infiltration" bei STÖSS (1955); "Kolonieausläufer", "Einwachsen" bei HENNEBERG (1957); "Verwurzelung" bei HENNEBERG et al. (1963)

usf.) Tiefenwachstum scheint bei bestimmten, meist längere Zellverbände bildenden Bakterien besonders häufig vorzukommen wie z.B. bei Actinomyceten als sog. Substratmycel (LIESKE 1921; WAKSMAN 1967), Bacillus mycoides (STÖSS 1955; KRASSILNIKOV 1959) oder Mycobakterien und Corynebakterien (HENNEBERG 1957).
LEWIS (1933) beschreibt von Bacillus mycoides "haftende" Varianten mit Tiefenwachstum und "nichthaftende" ohne dieses, womit für erstere Variante eine charakteristische Eigenschaft genannt ist.
Für Kolonien von Mycobacterium tuberculosis erwähnen LEWICKI (1958) sowie HENNEBERG u. WOLFF (1963) unregelmäßiges Tiefenwachstum, das auch als "zentrale Verwurzelung" vorliegen kann und vermutlich nicht durch spontanes und aktives Eindringen in das Substrat entstanden ist, sondern aus Zellen, die bei der Beimpfung in Unebenheiten und Vertiefungen des Nährbodens eingedrückt wurden.
Bei den Erscheinungen, die EISENBERG (1906) als "sekundäre Bakterienkolonie" unter durchscheinenden Strichbeimpfungen beschrieben hat, dürfte es sich ebenfalls um Tiefenwachstum handeln, für dessen Entstehung der Autor aktive Bewegungen der Zellen oder passive durch Diffusionsströme im Substrat annimmt.
Daß Bakterienwachstum im Substrat, das mit einer Oberflächenkolonie in Verbindung steht, auch von der Definition abweichendes primäres Wachstum darstellen kann, zeigen die Befunde von GREENE (1938) bei Bacillus acetoaethylicum. Oberflächenkolonien von diesem sind mit sog. "zentralen Tiefenlappen" versehen, wobei letztere den Ausgangspunkt darstellen in Form aus Schüttelkulturen entstandener ehemaliger Tiefenkolonien. Diese haben nach der schon von ORSOS (1910) beschriebenen Weise durch starkes Wachstum den Agar nach oben durchbrochen und erst sekundär dessen Oberfläche bewachsen.
Während Tiefenwachstum bei vielen Species unter gleichen Kulturbedingungen nicht regelmäßig aufzutreten scheint, beschreiben BARTMANN u. HÖPKEN (1963) für Kolonien der durch Penicillin ausgelösten L-Form von Proteus gewissermaßen obligates Tiefenwachstum. Infolge besonderer Eigenschaften der L-Zellen vermögen sich diese nur nach Eindringen in ein weiches Substrat durch Knospung und Sprossung zu vermehren, das von FETTING (1957) als primäres Tiefenwachstum bezeichnet wird, von dem Teile wieder nach oben wachsen und ein sekundäres Oberflächenwachstum ausbilden.

Am ausgeprägtesten konnten wir Tiefenwachstum für Bacillus subtilis (auf BPA, WgA und BPA + 1,0 % Chloramphenicol/ml) und Bacillus mycoides (auf BPA bei Zimmertemperatur und + 37°, WgA und BPA + 1 I.E. Penicillin/ml) sowie in sehr geringem Maße für Bacillus cereus (auf BPA und BPA + 1,0 % Chloramphenicol/ml) und Bacillus polymyxa (auf BPA) nachweisen.

Bei Bacillus subtilis erscheint das Tiefenwachstum auf BPA im Schnitt

erstmalig nach 5 Tagen etwa halbkreisförmig unter den Stellen wulstiger Kolonieaufwölbungen im Übergangsbereich Koloniekörper -Zuwachsrand. Die Zellen entspringen der Basalschicht und reichen nach außen bis zu deren Ende. Räumlich gesehen nimmt das Tiefenwachstum aus lockeren Zellketten etwa einen kranzförmigen Bereich unter dem Oberflächenwuchs ein. Die weitere Ausbreitung erfolgt in zentrifugaler und zentripetaler Richtung sowie nach unten, bis im Alter von 20 Tagen der Raum unter dem Koloniekörper locker ausgefüllt ist.

Ähnlich vollzieht sich die Entwicklung auf WgA, aber wegen des schwächeren Wachstums auf diesem Substrat ist die Ausbreitung geringer, auch klumpiger und weniger gleichmäßig. Unter Chloramphenicol-Einfluß bleibt das Tiefenwachstum sehr gering in klumpiger und unregelmäßiger Anordnung auf den Raum unter den proliferationsartig erhabenen Kolonieteilen beschränkt und ist bei schwacher Versporung bereits weitgehend zerfallen.

Der verwendete Stamm von Bacillus mycoides scheint unter verschiedenen Kulturbedingungen stark zu Tiefenwachstum zu neigen und läßt dieses nur auf WgA bei + 37° vermissen. Auf letzterem Substrat zeigte das Oberflächenwachstum nach 10 Tagen einen Aufbau aus atypischen heteromorphen Zellen, der ähnlich bei + 37° bereits nach 2 Tagen vorhanden war, so daß in der Kombination von Mangelnährboden und erhöhter Bebrütungstemperatur auch die Ursache für das Fehlen des Tiefenwachstums zu suchen ist.

Die typischen Mycoides-Kolonien auf beiden Substraten unter Zimmertemperatur sind in der Art des Tiefenwachstums übereinstimmend, das locker von den erhabenen Hauptsträngen vor allem im Koloniezentrum ausgeht und lediglich auf dem Mangelnährboden schwächer wächst. Auf BPA erreicht es von allen Formen die stärkste Ausdehnung in die Breite wie in die Tiefe. Letztere beträgt bei Bacillus subtilis und mycoides ein Mehrfaches der Höhenausdehnung des betreffenden Oberflächenwachstums, wodurch das Tiefenwachstum auch makroskopisch gut zu erkennen ist.

Die Bauelemente des Tiefenwachstums entsprechen zuerst denjenigen in der Basalschicht, von der aus dieses seinen Anfang nimmt. Mit zunehmender Ausbreitung beginnt in den kolonienahen und ältesten Teilen bereits Versporung und Alterung, erwartungsgemäß am frühesten auf dem Mangelnährboden. In diesem Stadium erfolgen auch in den äußersten und jüngsten Teilen Veränderungen an den Zellen, die weitgehend atypisch, also vor allem dick, rundlich und heteromorph werden. Dies bedingt ein geringeres Ausbreitungsvermögen, und dementsprechend sind diese Teile nicht mehr locker und fädig, sondern klumpig aggregiert und können im Extremfall kompakten Tiefenkolonien völlig gleichen.

Deutliche Sekundärkolonien im Tiefenwachstum von teils beträchtlichen Ausmaßen kamen nur bei Bacillus subtilis auf BPA im Alter von 30 Tagen vor. Diese liegen in altersmäßig sehr unterschiedlichen Bereichen mit starker Versporung und übertreffen zum Teil im Durchmesser die Höhenausdehnung des Oberflächenwachstums. Die Sekundärkolonien sind überwiegend sehr dicht und kompakt, so daß unter den heteromorphen Bauelementen rundliche und ovale dominieren, die sich sehr stark anfärben.

Eine weitere Differenzierung des Tiefenwachstums, die nur für eine Form festgestellt werden konnte, fand sich bei Bacillus mycoides auf BPA bei + 37°. Die erhöhte Bebrütungstemperatur ruft an den Zellen unterschiedliche aberrante Krümmungen hervor, die glattähnliche, stark von dem charakteristischen Bild für Bacillus mycoides abweichende Kolonien aufbauen. Tiefenwachstum kommt einmal diffus unter deren zentralem Teil vor und dann weiter außen kompakter unter dem Übergang zum Zuwachsrand. Diese Anordnung im Alter von 2 Tagen ähnelt einer Kombination des beginnenden Tiefenwachstums bei Bacillus subtilis mit dem von Bacillus mycoides unter Zimmertemperatur. Nach 10 Tagen haben sich daraus zwei getrennte Lagen aus unterschiedlichen Zellen entwickelt, die auch im Grad der Versporung differieren.

Über die Ursachen des aktiven und nicht durch besondere Verhältnisse

bei der Beimpfung verursachten Tiefenwachstums von Bakterienkolonien, für das wir die vorgenannten Befunde zumindest bei Bacillus subtilis und mycoides ansehen, sind in der Literatur keine Angaben zu finden. Lediglich HUTCHINSON (1907) setzt sich kritisch mit Vermutungen von WILL über das Entstehen und die Bedeutung "rhizoider Anhänge" der Unterseite von Hefekolonien, auch als "Mycel" bezeichnet, auseinander, bei denen es sich offensichtlich um Tiefenwachstum handelt. HUTCHINSON vermutet als auslösenden Faktor für diese Erscheinungen Alterung der Kultur und nimmt für die Ursache der Wachstumsrichtung positiven Chemotropismus der Nahrungsstoffe und negativen der Stoffwechselprodukte an. Auch sieht er keinen Anlaß zu der Annahme, daß Tiefenwachstumszellen der Zuführung von Nahrungsstoffen in Richtung auf die Kolonie nach der Art einer Arbeitsteilung dienen könnten.

Abgesehen davon, daß eine Leitfunktion des Tiefenwachstums vom zellulären Aufbau und den Individualitätsverhältnissen einer Bakterienkolonie aus gesehen keine Grundlage hat, sprechen auch der Zeitpunkt des Auftretens und die unterschiedliche quantitative Ausprägung bzw. dessen Fehlen in anderen Fällen gegen eine solche Hypothese.

Es läßt sich feststellen, daß einmal Tiefenwachstum frühzeitig und stark in Erscheinung tritt bei Bacillus mycoides als einer Form mit ausgeprägt starren und langen Zellketten, die für das Eindringen in das Substrat besonders geeignet scheinen (Bei Bacillus mycoides konnte auch an lebenden und wachsenden Mikrokolonien spontanes Hineinwachsen von Zellketten in den Nährboden beobachtet werden). Zum anderen geht massierter Beginn von Tiefenwachstum fast immer von erhabenen Kolonieteilen aus. Eine Ausnahme davon stellt z.B. Bacillus cereus unter Chloramphenicol-Einfluß dar, wo im Bereich des relativ geringen und kompakten Tiefenwachstums die Basalschicht zu fehlen scheint und deshalb die Koloniehöhe geringer ist als in dem übrigen "kompletten" Teil. Vermutlich stellt das Tiefenwachstum die durch besondere Druck- oder Spannungsverhältnisse in diesem Kolonieteil in das Substrat gedrängte ehemalige Basalschicht dar.

Aus diesen Beobachtungen an Schnittbildern mit Tiefenwachstum lassen sich Faktoren ableiten, die einzeln oder zusammen für den Beginn von Bakterienwachstum in das Substrat von Bedeutung zu sein scheinen:

1) Vorhandensein teilungsfähiger länglicher Zellen im untersten Teil der Basalschicht, bevorzugt im Übergangsbereich von Koloniekörper und Zuwachsrand,

2) starre und lange Zellketten und

3) Druck bzw. Ausbreitungshemmung durch erhabene, kompakte Kolonieteile auf sich teilende Zellen mit Expansionsbestreben im basalen Bereich.

Wenn auch in anderen Fällen Substratunregelmäßigkeiten und die Art der Beimpfung eine Rolle spielen, dürften diese für das besonders unter Normalbedingungen regelmäßig an bestimmten Koloniestellen beginnende Tiefenwachstum im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht grundlegend von Bedeutung sein, sondern vielmehr Eigenschaften der Kolonien bzw. ihrer Bauelemente das Wachstum in das Substrat auslösen. Auf das weitere Wachstum werden neben mechanisch hemmenden Eigenschaften des Substrates wohl vor allem physiologische Faktoren wirksam werden wie die bereits von HUTCHINSON (1907) erwähnten richtenden positiven oder negativen Einflüsse von Nährstoffen bzw. Stoffwechselprodukten und deren Wirkung auf die Zellform sowie für aerobe Organismen die in der Tiefe des Substrates abnehmende Sauerstoffspannung.

6.3 Sporenbildung

Bei bestimmten Bakterien (Bacillaceae) vermögen die vegetativen Zellen überwiegend nach Beendigung der logarithmischen Wachstumsphase Endosporen (abgekürzt "Sporen") zu bilden, die Dauerform darstellen. Die sporenbildenden Zellen werden als "Sporenmutterzellen" bezeichnet, deren Reste unterschiedlich lange erhalten bleiben, aber letzlich immer zerfallen, um die Spore freizugeben.

Der charakteristischen Eigenschaft der Sporenbildung, die auch mit Er-

scheinungen des Sekundärwachstums (siehe unter 6.4) in Zusammenhang steht, haben wir bei den untersuchten Species besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Die Versporung der Zellen läßt sich an den Kolonieschnitten gut verfolgen.

An Hand von Schnittpräparaten wurde die Sporenbildung in Kolonien von Vertretern der Gattungen Bacillus und Clostridium nur von HUTCHINSON (1907); GREENE (1938); STÖSS (1955) und HENNEBERG (1957) untersucht. Dabei ergab sich, daß die Versporung in jungen Kolonien meist auf bestimmte Teile bzw. Schichten beschränkt ist und bei Oberflächenkolonien von deren Zentrum her, also mit den ältesten Zellen, beginnt. Mit zunehmendem Alter können auch äußere Kolonieteile versporen.

Ovale Tiefenkolonien von Aerobiern (z.B. Bacillus acetoaethylicum) ebenso wie Anaerobier (Clostridium acetobutylicum) versporten hauptsächlich in der äußersten Kolonieschicht. Bei jüngeren Oberflächenkolonien verschiedener Bacillus-Species beginnt die Versporung meist in der Mittelschicht und seltener auch in der Basalschicht.

Die Schnittpräparate der von uns untersuchten Kolonien zeigten hinsichtlich der Verteilung der Sporen und der Lokalisierung des Versporungsbeginnes ein vielfältiges Bild.

Die Sporen waren mit der Sporenfärbung nach KLEIN im allgemeinen gut von den vegetativen Zellen zu unterscheiden. Aber auch mit der einfachen Viktoriablau-Färbung ergab sich für Kolonieschnitte jüngerer Stadien mit eben versporenden Zellen eine gute Differenzierung. Der Hell-Dunkel-Kontrast von nicht angefärbter Sporen und kräftig angefärbter Sporenmutterzelle erwies sich besonders für Fotografien als geeignet.

Auffällig war die vielfach sehr unterschiedlich starke Anfärbung der einzelnen Sporen in älteren Kolonien auf WgA mit der Sporenfärbung nach KLEIN, wobei meist eine geringe Zahl von Sporen sehr stark und die Mehrzahl kaum angefärbt schien. Dieselbe Erscheinung trat auch bei hitzefixierten Ausstrichpräparaten derselben Entnahmen auf, so daß eine Abschwächung der Anfärbbarkeit in Zusammenhang mit Entwässerung und Einbettung nicht anzunehmen ist. Die geringe Anfärbbarkeit der

Sporen fiel vor allem in der unteren Koloniehälfte und den Zuwachsrändern auf. Hierbei handelt es sich um Kolonieteile, in denen entweder bei geringem Wachstum ein früher Beginn der Alterung eintritt und die hinsichtlich der Sauerstoffversorung benachteiligt sein können oder aber durch Alterung und den Einfluß von Stoffwechselprodukten gehäuft atypische Bauelemente vorhanden sind. So könnten als Ursache für die geringe Anfärbbarkeit zahlreicher Sporen beginnende Alterungserscheinungen der Zellen und die Beeinflussung durch Stoffwechselprodukte, aber auch der Mangel an spezifischen und für die normale Ausbildung der Sporenhülle erforderlichen Substanzen in Frage kommen.

Nach THIMANN (1964) sind für die erschwerte Anfärbung der Sporen mit basischen Anilinfarben wahrscheinlich die Schichtenstruktur der Sporenhülle und deren besondere chemische Zusammensetzung verantwortlich. Chemische Analysen der Sporenhülle z. B. von Bacillus subtilis (SALTON u. MARSHALL 1959) ergaben neben Bestandteilen, die für die vegetative Zellwand bekannt sind, zusätzlich einen hohen Anteil an verschiedenen Aminosäuren, so daß Protein den Hauptbestandteil ausmachen dürfte. Daneben ist aber für die Sporenhülle der Gehalt an Ca-Dipicolinat charakteristisch (POWELL 1953), der einen Faktor für die Hitzeresistenz der Sporen darstellen soll und nach GIESBRECHT (1969) in der Sporenrinde oder "Cortex" lokalisiert ist.

Die Hitzeresistenz der Sporen kann durch Mangel an Calcium (SLEPECKI u. FOSTER 1959) oder Mangel an Dipicolinsäure (CHURCH u. HALVORSON 1959) verringert werden. Nach POWELL u. STRANGE (1953) wird während der Sporenkeimung u. a. Ca-Dipicolinat ausgeschieden. Da die Sporen im "vorvegetativen Stadium" (JENSEN 1950/52) ihre Hitzeresistenz verlieren und die erschwerte Durchlässigkeit der Sporenhülle für Anilinfarben schwindet, scheinen beide Eigenschaften miteinander gekoppelt zu sein und beruhen vielleicht auf dem Fehlen von Ca-Dipicolinat.

So könnte auch die geringe Anfärbbarkeit von Sporen auf WgA eine Mangelerscheinung an Calcium, Dipicolinsäure bzw. Ca-Dipicolinat darstellen. Ebenfalls fände die auffällig hohe Zahl nicht keimender Sporen aus alten Kulturen auf WgA nach vorheriger Erhitzung zur Abtötung vegetativer Formen, die bei der Beobachtung von Mikrokolonien in Erscheinung trat, hierdurch eine Erklärung.

Lediglich für Bacillus polymyxa war Sporenbildung an Hand von Kolonieschnitten nicht nachzuweisen. Für Befunde an einem oder wenigen medianen Kolonieschnitten, von denen üblicherweise auf die gesamte Kolonie geschlossen wird, erweist sich in diesem Fall eine gewisse Vorsicht bei der Verallgemeinerung angebracht. Dasselbe gilt für Details und Differenzierungen, die im Gegensatz z.B. zu Schichtungen innerhalb der Kolonie nur äußerst sporadisch verteilt vorkommen. Wenige Sporen waren nämlich auch in älteren Kolonien von Bacillus polymyxa auf BPA vorhanden, die aber nur durch die Entnahme größerer Mengen von Koloniematerial in Ausstrichpräparaten festgestellt werden konnten. Auf dieselbe Weise zeigten auch Bacillus subtilis auf BPA sowie Bacillus pumilus auf BPA und WgA den eindeutigen Beginn der Sporenbildung im Alter von 2 Tagen, während die Medianschnitte dieses Stadiums dafür keinen sicheren Anhalt gaben.

Für die übrigen Formen war auf BPA erst an den Schnittpräparaten im Alter von 10 Tagen stärkere Versporung zu erkennen, deren Beginn allerdings sicherlich weitaus früher eingetreten ist. Auf WgA begann dagegen die Sporenbildung an Hand der Schnitte in unterschiedlicher Quantität schon nach 2 Tagen, und die Kolonien unter Chloramphenicol- bzw. Penicillin-Einfluß waren bei der einzigen Entnahme im Alter von 15 Tagen ebenfalls versport.

Grundästzlich beginnt für alle Formen die Sporenbildung in Teilen des Koloniezentrums. Weitere Übereinstimmungen der einzelnen Befunde waren am ehesten auf Bouillon-Pepton-Agar zu erkennen, wo für Bacillus subtilis, pumilus und cereus (Glatt-Variante) die Sporulation zuerst auf die Mittelschicht beschränkt ist. Damit werden für Bacillus subtilis und pumilus die Angaben von STÖSS (1955) bestätigt, die sich allerdings auf eine Bebrütungstemperatur von + 37^{o} beziehen im Gegensatz zu dem Wachstum unserer Kulturen bei Zimmertemperatur. Demnach scheint erhöhte Bebrütungstemperatur lediglich auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der Kolonien und den Zeitpunkt des Versporungsbeginnes einzuwirken, ohne daß sich qualitative Abweichungen ergeben.

Mit zunehmendem Alter der Kolonien werden Schichtung und Strukturierung des Koloniekörpers bei Bacillus pumilus und später auch bei Bacillus subtilis von der Basis her undeutlich und schwinden weitgehend. Die Versporung durchzieht dann die gesamte Höhenausdehnung und greift auch auf die älteren Teile des Zuwachsrandes über. Für beide Species ist anzunehmen, daß die ehemalige Basalschicht nur am geringsten versport und frühzeitig zusammenfällt, während Bacillus subtilis auch in der Deckschicht Sporen bildet. Bei Bacillus pumilus sind die Zellen der ehemaligen Deckschicht überwiegend zerfallen und bleiben als komprimierte und stark verschleimte Schicht erhalten, die nur vereinzelt Sporen aufweist.

Deutlich versporen dagegen bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) später auch die Basal- und Deckschicht, und die Struktur der Kolonie bleibt weitgehend erhalten. Es fällt für diese Form auf, daß die Quantität der Versporung in der gesamten Kolonie mit zunehmendem Alter nicht erwartungsgemäß zu-, sondern vielmehr abnimmt. Dort, wo Sporen zu erwarten wären, befinden sich zahlreich atypische, stark anfärbbare Zellen, die sich deutlich von noch vorhandenen "primären" und zerfallenden Zellen unterscheiden und nur als Sekundärwuchs aus Sporen zu deuten sind.

Die rauh wachsenden Species mit flachem und ungeschichtetem Koloniaufbau ähneln sich untereinander auch hinsichtlich der Versporung. Bei Bacillus mycoides beginnt diese unlokalisiert, läßt aber später eine Häufung im oberen Teil der angeschnittenen Zellstränge erkennen. Bacillus cereus versport dagegen fast ausschließlich in der oberen Koloniehälfte, so daß sich für beide miteinander verwandten Formen ähnliche Befunde ergeben.

Nur bei erhöhter Bebrütungstemperatur von + 37° weicht Bacillus mycoides auf BPA völlig von dem bisherigen Versporungsschema ab. Bei fehlender oder zumindest im Rahmen der Entnahmen nicht erkennbarer Schichtung

sind im Alter von 12 Tagen lediglich die Koloniebasis und die darunter befindliche Lage des stark differenzierten Tiefenwachstums versport.

Unterschiedliche Befunde liegen vor von den Kolonien auf WgA als Mangelnährboden und auf dem Hemmnährböden mit Antibiotikumzusatz.

Auf Weizengrießagar zeigen Bacillus cereus (Glatt-Variante) und Bacillus mycoides bei + 37° im Alter von 2 Tagen bereits einen geschichteten Aufbau, und in diesem Stadium sind die Sporen auf die Deckschicht bzw. die Mittel- und Deckschicht beschränkt. Auch bei Bacillus subtilis und cereus mit Kolonien von einfachem und ungeschichtetem Aufbau beginnt die Versporung in der oberen Koloniehälfte. Dagegen befinden sich bei Bacillus pumilus und mycoides im Alter von 19 Tagen und bei Bacillus polymyxa im Alter von 15 Tagen die Sporen ohne deutliche Lokalisierung über den Koloniekörper verstreut. Die älteren Stadien aller Formen sind unterschiedlich stark über die gesamte Höhenausdehnung des gealterten und zusammengefallenen Koloniekörpers und Teile des Zuwachsrandes versport.

Auf den Hemmnährböden mit Chloramphenicol-Zusatz haben alle getesteten Species teilweise oder durchgehend einen geschichteten Kolonieaufbau. Bei Bacillus subtilis wechseln proliferationsartig erhabene und stark gealterte Kolonieteile, die durchweg nur geringfügig versport sind, mit gleichmäßig flachen ab und lassen schwache Versporung in der Mittelschicht sowie stärkere in der Basalschicht erkennen. Letztere Verteilung der Sporen gilt gleichfalls für Bacillus pumilus, während Bacillus cereus in allen primären Schichten nur wenige Sporen aufweist.

Unter Penicillin-Einfluß ist die Kolonie von Bacillus cereus nur in dem von Nachbarkolonien ungehemmten Teil geschichtet, und Sporen befinden sich am zahlreichsten in der Basalschicht, weniger in der Mittel- und Deckschicht. Der übrige flächenmäßig dominierende Teil der Kolonie ist nur in der oberen Hälfte versport und entspricht damit der Norm auf BPA,

wobei sich in Richtung auf den Zuwachsrand diese Lokalisation zunehmend verliert. Für Bacillus pumilus und mycoides sind die Kolonien in ihrer Gesamtausdehnung stark versport, und letzteres entspricht weitgehend der Norm auf BPA.

Im Gegensatz zu den differierenden Befunden für das Oberflächenwachstum zeigt die Versporung des Tiefenwachstums bis auf den bereits erwähnten Bacillus mycoides bei + 37° auf BPA einheitliche Züge. Die Sporenbildung beginnt in den ältesten Teilen nahe der Substratoberfläche und setzt sich mit zunehmendem Alter der Kolonien gleichmäßig mehr oder weniger weit bis in die äußeren Bereiche fort.

Zusammenfassend ergibt sich für die Versporung:

1) Auf dem Standardnährboden Bouillon-Pepton-Agar beginnt die Sporenbildung für glatte Kolonien mit Schichtenstruktur in der Mittelschicht, während die rauhen und einfach aufgebauten Kolonien aus wellig gewundenen Zellsträngen nicht lokalisiert oder gehäuft in der oberen Hälfte versporen.

2) Auf dem Mangelnährboden Weizengrießagar beginnt die Versporung deutlich früher als auf BPA, und die Sporen sind meist nicht lokalisiert über den Koloniekörper verteilt oder überwiegen in dessen oberer Hälfte.

3) Mit zunehmendem Alter der Kolonien geht nach anfänglich lokalisierter Versporung diese vielfach auch in vertikaler Richtung auf unversporte Bereiche bzw. Schichten über. Stets aber dehnt sich die Versporung in horizontaler Richtung über den Koloniekörper hinaus mehr oder weniger weit auf den Zuwachsrand aus.

   Da die einzelnen Stadien einer Entnahmeserie jeweils von anderen Kolonien stammen, ist eine sichere Aussage nicht immer möglich, ob tatsächlich eine Ausdehnung der Versporung auf anfangs unversporte Bereiche erfolgt ist oder nur durch Undeutlichwerden der Strukturen als Folge von Versporung, Zerfall vegetativer Zellen und Zusammenfallen der Kolonie eine über die gesamte Höhenausdehnung eingetretene Versporung vorgetäuscht wird.

4) Die Befunde unter "Normalbedingungen" deuten zumindest eine anfängliche Bevorzugung der mittleren und oberen Kolonieteile für die Versporung an, wohingegen bei erhöhter Bebrütungstemperatur bzw. unter Chloramphenicol- oder Penicillin-Einfluß davon abweichend die Versporung auch auf den basalen Bereich der Kolonie beschränkt oder dort gehäuft erfolgen kann.

5) Die unterschiedliche Lokalisierung des Versporungsbeginnes in Abhängigkeit von Species, Nährboden und Temperatur erscheint unter jeweils gleichen Bedingungen konstant aufzutreten und teilweise artspezifisch zu sein.

Die unterschiedlichen Befunde erschweren deren Deutung und lassen vorerst nur Vermutungen zu über die Ursachen, die einer lokalisierten bzw. nicht lokalisierten Versporung innerhalb von Bakterienkolonien zugrundeliegen. Über allgemeingültige physiologische Voraussetzungen für die Sporenbildung in der ehemals vegetativen Zelle bestehen bisher nur ungenügende Vorstellungen.

Folgende Faktoren endogener und exogener Art, die von Art zu Art differieren können, gelten als Voraussetzung für den Beginn der Sporenbildung:

1) Genetisch fixierte Befähigung der Zelle zur Sporenbildung,
2) "Vitalität" der Zelle,
3) Beendigung der logarithmischen Wachstumsphase (WINKLER 1956), also Erreichen eines bestimmten Entwicklungs- bzw. Alterungszustandes der Zelle,
4) Vorhandensein von Calcium-Ionen und Luftsauerstoff (bei Aerobiern) und
5) allgemeine Verarmung des Substrates an Nährstoffen als Folge von Wachstum und Zellteilung bzw. Abwesenheit spezieller Substanzen, die sich als sporulationshemmend erwiesen haben wie z.B. Glucose, Alanin und Fettsäuren mit 10 bis 14 C-Atomen (HARDWICK et al. 1951), Norleucin (THIMANN 1964) oder Säure als Abbauprodukt von Glucose (GREENE 1938).

Von den angeführten Faktoren scheinen 2), 3) und 4) für unsere Befunde von besonderer Bedeutung.

Zu 2) und 3). Auf das Versporungsvermögen als Eigenschaft der "gesunden" bzw. intakten und vitalen Zellen weisen bereits HOLZMÜLLER (1909) und später KNAYSI (1945) hin. Zu einer gewissen Präzisierung des Begriffes "gesund" als Eigenschaft der Bacillus-Zelle können wir an unseren Untersuchungen bestätigen, daß eindeutige Versporung im allgemeinen nur an Zellen eintrat, die keine extremen Abweichungen von der Norm in bezug auf Morphologie, Erhaltungszustand der Zellkonturen und Anfärbung

erkennen ließen.
Als Beispiel sei Bacillus mycoides auf WgA bei + 37° genannt, dessen Kolonien bereits im Alter von 2 Tagen überwiegend aus atypischen und stark heteromorphen Zellen bestanden. Diese waren entweder in der Basalschicht kaum anfärbbar oder erschienen in der Mittel- und Deckschicht nach der Färbung granuliert und "scheckig". Unter diesen sind nur wenige versporte Zellen zu finden, die ihrerseits morphologisch normal scheinen. Die Zahl der Sporen blieb auch bei den weiteren Entnahmen gleichermaßen gering, da aus Mangel an "gesunden" Zellen keine weitere Versporung erfolgen konnte.

Auf denselben Ursachen beruht auch die Abnahme bzw. das völlige Fehlen von Sporen in den äußersten Teilen des Zuwachsrandes älterer Kolonien, die überwiegend aus gealterten und atypischen Zellen bestehen. Selbst wenn diese Zellen noch ein geringfügiges Teilungsvermögen aufweisen, sind sie zur Sporenbildung nicht mehr befähigt.

Wie bereits bei der Entstehung der Schichten glatter Kolonien ausgeführt wurde, tritt hinsichtlich der Teilungsaktivität ihrer Zellen die Basalschicht besonders im zentralen und ältesten Teil gegenüber der sich nach oben und außen ausbreitenden Mittelschicht stark zurück. So erfolgt bei den meisten Formen für die Zellen der Basalschicht frühzeitige Alterung mit einer Tendenz zum Zerfall, wodurch wahrscheinlich auch die Sporenbildung weitgehend unmöglich wird, obgleich diese Schicht aus denjenigen Zellen besteht, die am frühesten den unter 3) genannten Entwicklungszustand als eine Voraussetzung für den Beginn der Versporung erreicht haben. Von allen aufgeführten Faktoren ist der letztgenannte für die vorliegenden Befunde am deutlichsten zu bestätigen, da die Versporung stets in den zentralen und zugleich ältesten Teilen der Kolonie ohne Ausnahme beginnt. Deshalb können wir THIMANN (1964) nicht zustimmen, der zwar die Sporenbildung z.T. als Funktion des Alters ansieht, aber zugleich vermutet, daß bei einigen Bacillen wie z.B. Bacillus subtilis mindestens einige Sporen zu j e d e r Z e i t anzu-

treffen seien.

Zu 4). Solange wir über die Diffusionsverhältnisse innerhalb von Bakterienkolonien nur auf Vermutungen angewiesen sind, kann auch für die Sauerstoffspannung in den einzelnen Kolonieschichten sowie im Substrat lediglich angenommen werden, daß diese nahe der Oberfläche höher ist als in der Basalschicht bzw. in der Tiefe des Substrates. Bei der Bedeutung des Sauerstoffes für die obligat aeroben Formen besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Sauerstoffspannung in den oberen Kolonieteilen, die ein stärkeres Wachstum mit nachfolgender Versporung der Zellen erklären könnte entsprechend den Befunden, die in diesen Bereich bevorzugte Versporung ergaben. Auf die Bedeutung des erhöhten Sauerstoffangebotes in den oberen Kolonieschichten für die Versporung wies bereits HUTCHINSON (1907) hin und hielt diesen Faktor bedeutungsvoller als die vermutlich bessere Versorgung der basalen Kolonieteile mit Nährstoffen wegen deren größerer Nähe zum Substrat. Dem steht wohl nur scheinbar entgegen, daß sich für das Tiefenwachstum im allgemeinen keine Bevorzugung bestimmter Bereiche erkennen läßt, obwohl diese zu erwarten wären, wenn die Sauerstoffspannung im Substrat allmählich geringer wird. Aber das diffuse und lockere Tiefenwachstum mit starker Ausbreitungstendenz unterscheidet sich hinsichtlich der gegenseitigen Konkurrenz und Hemmung benachbarter Zellen sicher grundlegend von dem dichten und gedrängten Oberflächenwachstum und weist insofern günstigere Wachstumsbedingungen auf.

Für die Lokalisierung der Versporung in Zusammenhang mit der Sauerstoffversorgung der Zellen sind sicherlich auch vorhandene spezifische Ansprüche der einzelnen Species von Bedeutung, die bereits wieder für deren Stämme oder Varianten unterschiedlich sein können.

Bei der Entwicklung der Bacillus-Kolonien wirken jeweils zahlreiche Faktoren aufeinander wie auf die Zellen ein, so daß für weitere Einblicke in diese Zusammenhänge, vor allem hinsichtlich der Versporung im Kolonieverband, gezielte Untersuchungen erforderlich sind (z. B.

Untersuchung der Sporenlokalisation auf definierten synthetischen Substraten für zahlreiche Species bei unterschiedlichen Kulturbedingungen, besonders bei wechselndem Sauerstoffgehalt der umgebenden Luft, Messung der Sauerstoffspannung in unbewachsenem Agar in verschiedenen Tiefen sowie im Agar unterhalb von Bakterienkolonien unterschiedlichen Alters, unterschiedlicher Flächenausdehnung und Höhe usf.).

6.4 Sekundärwachstum

Mit dem übergeordneten Begriff "Sekundärwachstum" bezeichnen wir das Auftreten meist unregelmäßig angeordneter Zentren erneuter starker Zellvermehrung in Bakterienkolonien, deren primäre maximale Entwicklung bereits beendet ist. Der Beginn von Sekundärwachstum bzw. die Möglichkeit, dieses als solches zu erkennen, hängen von verschiedenen Faktoren ab und scheinen frühestens dann vorzuliegen, wenn der überwiegende Teil der Zellen des Koloniekörpers in die Ruhephase eingetreten ist (siehe auch 6.2.2.2).

Wir unterscheiden in quantitativer und qualitativer Hinsicht auf die Anordnung und Zusammensetzung der Bauelemente zwei Typen von Sekundärwachstum, die nicht immer scharf voneinander abzugrenzen sind:

a) Diffuses Sekundärwachstum. Dieses ist nur mikroskopisch nachzuweisen und besteht (nach unseren Befunden) aus locker und ungeordnet verteilten Zellen und Zellketten sehr unterschiedlicher Ausdehnung innerhalb der Primärkolonie.

b) Sekundärkolonien. In diesen liegen die Zellen gehäuft und lokalisiert auf mehr oder weniger abgegrenzte Bezirke vor bei unterschiedlich dichter Anordnung und sind nicht oder nur geringfügig mit primären Zellen bzw. Sporen durchsetzt.
Sekundärkolonien sind von unterschiedlicher Gestalt mit oft rundlichen Um-

rissen. Wenn sie allseits von Primärkolonie umgeben sind, erinnern sie vielfach an kompakte Tiefenkolonien innerhalb eines Nährsubstrates, mit dem Unterschied, daß hier die Bildung von "Kolonien in der Kolonie" (HENNEBERG 1957) stattfindet. Die Entwicklung von Sekundärkolonien kann aber auch im Innern einer Primärkolonie beginnen und durch starke Ausbreitung deren obere bzw. untere Begrenzung aufwölben oder durchbrechen, um sich u. U. auf der Oberfläche der Primärkolonie bzw. im Substrat weiter auszudehnen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben über "Sekundärwachstum", die aber hauptsächlich auf die makroskopisch sichtbaren Sekundärkolonien unterschiedlichster Art beschränkt sind. Nur wenige Autoren befassen sich eingehender oder ausschließlich mit diesen Erscheinungen (z. B. PREISZ 1904; MASSINI 1907; MÜLLER 1911; LEWIS 1933, 1934; BIERKOWSKI u. HACKENTHAL 1953/54; STOLP 1958).

Hinsichtlich der Bezeichnungen für Sekundärwachstum besteht bei den einzelnen Autoren erhebliche Uneinheitlichkeit. Am häufigsten wurden verwendet: "sekundäre Kolonie" bzw. "Sekundärkolonie" (PREISZ 1904; EISENBERG 1906, 1912; GARBOWSKI 1908; BEIJERINCK 1912; BENECKE 1912; HAAG 1927; SOULE 1928; GOTSCHLICH 1929; DOOREN de JONG 1931; LEWIS 1933, 1934; HENRICI 1934; PIEKARSKI 1940; STOLP 1958), "Knopf", "Knopfbildung" oder "Knöpfchenbildung" (BURK 1908; MÜLLER 1911; GYÖRGY 1920; PESCH 1924; HAAG 1927; GOTSCHLICH 1929; OESTERLE u. STAHL 1929; BIERKOWSKI u. HACKENTHAL 1953/54; HENNEBERG 1957; STUNKAT 1961). Daneben finden sich die Bezeichnungen "Knötchen" (PREISZ 1904, MASSINI 1907), "Tochterkolonien" (MÜLLER 1911; GOTSCHLICH 1929; SCHARIKOWA et al. 1966), "aufsitzende Kolonien" (HAAG 1927), "Papillae" (LEWIS 1933; HENRICI 1934; WILSON u. MILES 1964) sowie "Herdbildung" (STÖSS 1955; HENNEBERG 1957).

Parallel zu dem Begriff "Sekundärkolonie" benennen GOTSCHLICH (1929) und LEWIS (1933) die Ausgangsform als "Primärkolonie", dem wir uns anschließen (entsprechend auch "Sekundär-" bzw. "Primärzellen").

Die Angaben über die Zeit von der Beimpfung bis zum ersten makroskopisch sichtbaren Auftreten von Sekundärwachstum in oder auf Primärkolonien sind sehr unterschiedlich und bewegen sich zwischen frühestens einem Tag nach PREISZ (1904) für Bacillus anthracis bei + 37° bis zu drei Wochen nach HAAG (1916) für "Bacillus viridi-glaucescens". Der Durchschnittswert für die verschiedensten Formen liegt bei etwa sieben Tagen.

Die Anzahl der Sekundärkolonien pro Primärkolonie schwankt von einer über wenige bis zu "sehr vielen". Dabei scheint aus Gründen der Nährstoffkonkurrenz und gegenseitigen Hemmung die Beobachtung von EISENBERG (1912) eine gewisse Gültigkeit zu besitzen, daß entweder nur wenige große

oder zahlreiche kleine Sekundärkolonien gebildet werden.
Von der Quantität gesehen sind große und einzelnstehende Sekundärkolonien am auffälligsten, die wohl in Ausnahmefällen sogar die Ausdehnung der Primärkolonie übertreffen können (LEWIS 1934). Die Gestalt ist unterschiedlich und wird meist nur von den sichtbaren oberflächig auf der Primärkolonie gelegenen Anteilen beschrieben. Daß eine Sekundärkolonie u. U. bereits an der Basis der Primärkolonie beginnen kann und diese durchwächst, um mit nur einem kleinen Anteil unter oder über deren Oberfläche sichtbar zu werden, zeigt am Schnittbild zuerst MASSINI (1907).

Vielfach sind die Sekundärkolonien rundlich-erhaben, scharfrandig und in sich sehr einheitlich, so daß sie aufsitzenden Kolonien fremder Bakterien oder einer Mischkultur ähneln (PREISZ 1904). Dies trifft besonders für Sekundärkolonien bzw. deren Zellen zu, die in der Eigenfarbe oder der Fähigkeit ihrer Zellen, Farbbestandteile des Nährbodens freizusetzen und zu speichern, von der Primärkolonie stark abweichen (z. B. bei Staphylococcus aureus nach HACKENTHAL u. BI ERKOWSKI (1955) oder "Bacterium coli mutabile" nach MASSINI (1907). BEIJERINCK (1912) beschreibt leuchtende Sekundärkolonien von "Bacillus indicus", während die Primärkolonie infolge Alterung diese Eigenschaft nicht mehr aufweist.

Für rundlich-erhabene Formen trifft am ehesten die vielfach verwendete Bezeichnung "Knopf" zu. Sekundärkolonien können aber gerade zu Beginn ihrer Entwicklung oder bei einer Vielzahl kleiner Formen pro Primärkolonie unauffällig und schwer zu erkennen sein bzw. eine primär granulierte Kolonieoberfläche vortäuschen. Sehr unregelmäßig geformte Sekundärkolonien sind bisweilen von sog. "Sektoren" (siehe auch 6. 5. 1) nicht deutlich abzugrenzen. Auf die Gemeinsamkeiten von Sekundärkolonien und Sektoren weist ausdrücklich HENRICI (1934) hin, der beide als auffallende Charakteristika sog. "unstabiler Kulturen" ansieht.

Der Aufbau von Sekundärwuchs wurde nur in wenigen Fällen an Hand von Schnittpräparaten untersucht (MASSINI 1907; STÖSS 1955; HEN NEBERG 1957; STUNKAT 1966), wobei Einzelheiten über die zelluläre Feinstruktur meist fehlen. Lediglich HENNEBERG beschreibt Anfänge von "Knopfbildungen" bei Salmonellen und Corynebakterien, die makroskopisch nicht zu erkennen waren, sowie Herd- und Zonenbildungen bei Escherichia coli und Staphylococcus aureus aus morphologisch abweichenden Zellen innerhalb zerfallener Kolonien auf selenithaltigen Selektivnährböden.

Aufschlußreich sind die Schnittbilder von Salmonella- und Pseudomonas-Kolonien mit je einem zentralen sog. "Knopf" bereits im Alter von 1 Tag bei + 37°C bei STUNKAT (1966). Diese Kolonien zeigen einen deutlichen Aufbau aus 3 Schichten unterschiedlicher Anfärbbarkeit und durchziehen ohne Unterbrechungen oder Abweichungen auch den sog. Knopf. Ähnliche Befunde konnten wir für Kolonien von Bacillus subtilis mit zentraler Erhebung feststellen. Allein auf Grund der Feinstruktur sehen wir diese Erscheinungen nicht an als Sekundärwachstum entsprechend der eingangs genannten Definition. Dasselbe dürfte nach dem makroskopischen Erscheinungsbild z. B. für Staphylococcus Kolonien mit zentralen sog. "Knöpfchen" ("Einzelknopfbildung") nach HACKENTHAL u. BIERKOWSKI

(1954, 1957) gelten, wo es sich u.E. ebenfalls um eine spezifische Eigenschaft der Zellen bzw. der aus diesen entstandenen Kolonien handelt ohne Zusammenhang mit sog. "Mischinfekt" oder Sekundärwuchs.

Zahlreicher finden sich Angaben in der Literatur über den zellulären Aufbau von Sekundärkolonien, die durch direkte Untersuchung von mit der Öse entnommenem Material oder an Hand von Klatschpräparaten gewonnen wurden. Übereinstimmend werden die Zellen als abweichend von der Norm, pleomorph, "degenerierend", "unregelmäßig" oder "hefeähnlich" bezeichnet (PREISZ 1904; GARBOWSKI 1908; HAAG 1927; OESTERLE u. STAHL 1929; HENRICI 1934; PIEKARSKI 1940). Da PREISZ (1904) den Formenreichtum von Sekundärkoloniezellen bisweilen auch in normalen Primärkolonien fand, schloß er daraus auf makroskopisch nicht erkennbares Sekundärwachstum von sehr geringer Ausdehnung. Ähnlich äußerte sich BEIJERINCK (1912).

Sporenbildung von Sekundärkoloniezellen beobachteten lediglich PREISZ (1904) und EISENBERG (1912) bei Bacillus anthracis. Letzterer bezeichnete die Sporenbildung als mangelhaft oder ganz fehlend infolge "kümmerlicher" Ernährungsbedingungen.

Als Ausnahmen sind wohl "Tertiärkolonien" anzusehen, die PREISZ (1904) als feine Knötchen nicht selten auf Sekundärkolonien von Bacillus anthracis nennt, und ebenfalls von EISENBERG (1912) einmal bei Vibrio cholerae beobachtet sowie von BIERKOWSKI u. HACKENTHAL (1953/54) in Form feiner Knöpfchen auf "aufsitzenden Kolonien" von Corynebakterien beschrieben wurden.

Neben den bereits erwähnten zentralen Knöpfen gibt es noch andere sekundärkolonieartige Erscheinungen, die aber ebenfalls nicht unserer eingangs aufgeführten Definition von Sekundärwachstum entsprechen. Hierzu zählen der Bewuchs mit Fremdkeimen, wie es von OLSEN (1920) für Haemophilus influenzae auf Kolonien haemolysierender Streptococcen beschrieben wurde. Interessante Schnittbilder veröffentlichte HENNEBERG (1957) von künstlichen Mischkulturen aus Stäbchenbakterien und Kokken, die entweder unregelmäßig durcheinander gewachsene Kolonien bildeten oder im anderen Fall die Stäbchen rein als erhabener "Knopf" auf einem flacheren Kolonieteil aus überwiegenden Kokken wuchsen. Ebenfalls für künstliche Mischkulturen, z.B. von Sarcina und Serratia marcescens, erwähnt KORINEK (1934/35) das ringförmige Umwachsen eines zentralen Kolonie- "Kernes" aus jeweils fast reinen Anteilen.

Von besonderer Bedeutung ist die Frage nach der Herkunft bzw. den Ursachen für das Auftreten von Sekundärwachstum, wobei dieses vielfach in Primärkolonien oder Teilen davon erfolgt, die bereits gealtert oder in Zerfall begriffen sind. PREISZ (1904) stellte für Kolonien von Bacillus anthracis fest, daß 1) Sekundärkolonien umso früher und rascher entstehen, je eher der betreffende Stamm versporte, 2) nach Abtötung aller vegetativer Zellen bei + 65°C ebenfalls Sekundärkolonien entstanden und 3) diese ausblieben bei künstlich abgeschwächten asporogenen Stämmen. Hieraus folgert der Autor, daß Sekundärkolonien bei Sporenbildnern durch Auskeimen von Sporen entstehen, und BENECKE (1912) schließt sich dieser Ansicht,

wohl unter Berufung auf ersteren, an . EISENBERG (1912) läßt die Frage offen, ob Sekundärkolonien derselben Species durch nachträgliche Vermehrung einzelner Sporen oder aber vegetativer Zellen entstehen.

PREISZ (1904) glaubte nach seinen Befunden annehmen zu müssen, daß Sporenbildung nicht den "Schlußakt vegetativer Tätigkeit der Zelle" darstellt, sondern "ein dem Entwicklungskreise des normalen Milzbrandbacillus eigener Vorgang" ist, der sich wie die Teilung der Zellen in ein und derselben Kolonie wiederholen kann, wenn auch unvergleichlich seltener. Daneben stellt PREISZ (1904) aber auch Sekundärkolonien bei vielen nicht sporenbildenden Bakterien wie z.B. Corynebacterium und Vibrio fest. Für diese Formen vermutete er "auserlesene" Individuen, deren Lebenskraft jene der Durchschnittsbakterien weit übertrifft und die nach dem Altern des überwiegenden Teiles der Zellen einer Kolonie zur weiteren Vermehrung befähigt sind. Auch BENECKE (1912) vermutet das "Erstarken" einzelner Zellen oder Zellkomplexe zwischen abgestorbenen und abgeschwächten Zellen einer Kolonie aus bisher noch unbekannten Gründen, das vielleicht auf Kosten von Stoffen erfolgt, die aus geschädigten Stellen austreten. Unter Bezugnahme auf PREISZ (1904) führt logischerweise GARBOWSKI (1908) an, daß auch für Sporenbildner Sekundärkolonien aus besonders lebenskräftigen vegetativen Zellen entstehen könnten.

NEISSER (1906) und MASSINI (1907) lehnen für ihre Befunde an "Bacterium coli mutabile" Hypothesen des "Auflebens" oder "Erstarkens" von Zellen in mehr oder weniger abgestorbenen Kolonien ab. Das Auftreten von abweichend gefärbten Sekundärkolonien, deren Zellen im Gegensatz zu denen der Primärkolonie Lactose vergären können, bezeichnen diese Autoren als Mutation.
Auch BEIJERINCK (1912), EISENBERG (1912), DOOREN de JONG (1931), HENRICI (1934) und LEWIS (1934) sehen als Ursache für das Auftreten von Sekundärwachstum ebenfalls Mutationen oder mutationsähnliche Vorgänge an Zellen der Primärkolonie an und nehmen damit einen Standpunkt ein, der etwa den heutigen Auffassungen der Bakteriengenetik entspricht.

LEWIS (1933) stellte für Bacillus mycoides klar heraus, daß das regelmäßige Auftreten erhaben aufsitzenden Sekundärkolonien auf den Primärkolonien nach frühestens 6 Tagen erfolgt und an die Verarmung des Substrates an bevorzugten Nährstoffen gebunden ist. Im Gegensatz zu PREISZ (1904) bei Bacillus anthracis blieben in diesem Falle trotz Versporung der Stämme Sekundärkolonien aus, wenn die vegetativen Zellen durch Erhitzen abgetötet waren. Derselbe Autor deutete 1934 die Sekundärkoloniebildung auch für nichtsporenbildende Bakterien derart, daß während des Wachstums der Kolonie spontan positive Varianten bzw. Mutanten auftreten können, die nach Erschöpfung des Nährbodens für die überwiegende Anzahl der nicht mutierten Zellen die von letzteren nicht verbrauchten Nährstoffe aufzuschließen vermögen. Diese Nährstoffe wirken selbst nur selektiv, nicht aber mutationsinduzierend.

STOLP (1958) isolierte aus einer Kultur von Bacillus megaterium einen phagenresistenten Stamm (Glatt-Typ) mit höherer Vermehrungsgeschwindigkeit als spontan auftretende Rauh-Mutanten, die sich deshalb länger

als erstere vermehren können. Nach einer 2 - 3 Tage langen Alterung von maximal entwickelten Glatt-Kolonien bildeten sich auf diesen kleine Sekundärkolonien des Rauh-Typs. Außerdem war dieser Stamm gegenüber dem Ausgang wieder phagensensibel geworden, und die Zahl der Sekundärkolonien konnte mit der Anzahl der erfolgten Mutationsschritte in der Primärkolonie etwa gleichgesetzt werden.

Es ist wahrscheinlich, daß außer in den eingehender analysierten Untersuchungen (z.B. MASSINI 1907; MÜLLER 1911; LEWIS 1933, 1934; STOLP 1958) auch anderweitig die Zellen von Sekundärwachstum bzw. Sekundärkolonien in morphologischen oder physiologischen Merkmalen oder in beiden von denen der Primärkolonien abweichen und durch Mutation oder unter Phagenwirkung (DOOREN de JONG 1931) entstanden sind. Soweit von Sekundärkolonien Abimpfungen durchgeführt und untersucht wurden, ergaben sich dafür unterschiedliche Befunde. Aber überwiegend wurde direkt oder indirekt ersichtlich, daß die Autoren Sekundärwachstum als eine Erscheinung ansahen, die von den Zellen der primären Kolonien ausgeht und zwischen den primären und sekundären Zellen einer Kolonie ein "genealogischer Zusammenhang" HARM (1955) besteht. Auch BIERKOWSKI u. HACKENTHAL bzw. HACKENTHAL u. BIERKOWSKI (z.B. 1953/54, 1954 usw.) vertraten wohl bei ihren ausgedehnten Untersuchungen diesen Standpunkt, ohne aber die Frage nach der Entstehung des "Mischinfektes" als Ursache der "Knöpfchenbildung" eindeutig zu beantworten.

Für die untersuchten Species waren diffuses Sekundärwachstum sowie Sekundärkolonien unterschiedlicher Größe nachzuweisen bei Bacillus subtilis auf BPA und BPA + 1,0 ‰ Chloramphenicol/ml, Bacillus pumilus auf BPA und Bacillus cereus (Glatt-Variante) auf BPA, sowie nur in Form "aufsitzender" und makroskopisch auffälliger Sekundärkolonien bei Bacillus mycoides auf WgA bei + 37°C.

Makroskopisch konnten Sekundärkolonien frühestens nach 9 Tagen für Bacillus mycoides und für die übrigen Species zwischen 15 und 22 Tagen erkannt werden. Bei letzteren erschienen sie als winzige opake Granula zuerst im Primärkoloniezentrum. Sie nahmen unterschiedlich an Größe zu und waren später unregelmäßig über den gesamten Koloniekörper verteilt. Die größten von ihnen wölbten bisweilen die Kolonieoberfläche geringfügig vor.

Die Sekundärkolonien von Bacillus mycoides waren vom Beginn des makroskopischen Sichtbarwerdens an größer als die der übrigen Species

und schienen den durchscheinenden Primärkolonien erhaben aufzusitzen. Durch Alterung wurden die meisten Sekundärkolonien zunehmend undeutlich, und die von Bacillus mycoides schienen nach 30 Tagen völlig lysiert zu sein. Nur bei der Glatt-Variante von Bacillus cereus zeigten die Sekundärkolonien auch noch nach 30 Tagen unter z.T. auffälliger Aufwölbung der Primärkolonieoberfläche einen sonst äußerlich unveränderten Erhaltungszustand.

Weitaus vielfältiger und aufschlußreicher erwiesen sich erwartungsgemäß die mikroskopischen Befunde an Hand von Schnittpräparaten. Einschränkend muß dazu bemerkt werden, daß das in den Medianschnitten getroffene Sekundärwachstum bei dessen unregelmäßiger Verteilung über die Primärkolonie gewissermaßen Zufallsbefunde darstellt. Da aber für die Entnahmen mit Ausnahme von Bacillus subtilis unter Chloramphenicoleinfluß und Bacillus mycoides Sekundärwachstum in unterschiedlichster Ausprägung und Quantität über die Schnitte verteilt ist, darf angenommen werden, daß auch jeweils nur wenige Medianschnitte einer Kolonie als ausreichend repräsentativ genügen, um von diesen auf die durchschnittlichen Gegebenheiten der Gesamtkolonie schließen zu können.

Diffuses Sekundärwachstum tritt vor allem auf bei Bacillus subtilis (BPA) und Bacillus pumilus als sporadisch verteilte, sehr lockere und unregelmäßige Anordnungen von Zellen und Zellketten. Diese unterscheiden sich meist von noch vorhandenen Resten primärer Zellen weniger durch ihre Form als die starke Anfärbbarkeit und deutlichen Zellkonturen. Allerdings ist im Gegensatz zu den kompakteren Sekundärkolonien mit charakteristischen Umrissen eine Abgrenzung nicht immer eindeutig möglich. Bei den vorgenannten Species besteht diffuses Sekundärwachstum meist aus länglichen Zellen, die auf Grund ihrer Form besonders zur flächigen Ausbreitung in der mehr oder weniger zerfallenen Primärkolonie nach Art von Tiefenwachstum im Substrat neigen. Für Bacillus cereus (Glatt-Variante) gleichen die überwiegend kurzen, rundlichen oder gekrümmten Zellen mehr den Bauelementen vieler typischer Sekundärkolonien und

besitzen deshalb vermutlich ein geringeres Ausbreitungsvermögen. Derartige Zellen waren in dichter Anordnung bereits in den Kolonien nach 20 Tagen auffällig häufig vorhanden, so daß ein Beginn von diffusem Sekundärwachstum an zahlreichen Stellen zur etwa gleichen Zeit anzunehmen ist.

Die Sekundärkolonien sind auch im Schnitt wegen ihrer vor allem bei Bacillus subtilis und Bacillus cereus beträchtlichen Ausmaße und der starken Anfärbung ihrer Zellen sehr auffällig. Die Lokalisierung innerhalb der Primärkolonien läßt kein bestimmtes Prinzip erkennen, wenngleich sich grundsätzlich Sekundärwachstum immer in Kolonieteilen mit starker Versporung und zumindest gealterten vegetativen Zellen befindet bzw. von dort seinen Ausgang nimmt.

Am vielfältigsten sind die Umrißformen von Sekundärkolonien bei Bacillus subtilis (BPA), wo sie in den Primärkolonien bis in den Zuwachsrand hauptsächlich in folgender Anordnung vorkommen:

1) Im oberflächig gelegenen Teil der Primärkolonien

   a) bei geringem Durchmesser unregelmäßig verteilt im Raum zwischen oberer und unterer Koloniebegrenzung,

   b) den Raum zwischen oberer und unterer Koloniebegrenzung ausfüllend,

   c) unter der Kolonieoberfläche und diese gering vorwölbend,

   d) die Kolonieoberfläche eben durchbrechend oder bereits überwachsen,

   e) die basale Koloniebegrenzung vorwölbend oder durchbrochen und in das Substrat hinein ausgedehnt.

2) Im gesamten Bereich des Tiefenwachstums der Primärkolonie zwischen Substratoberfläche und dessen äußerer Begrenzung bzw. diese überwuchernd.

Sekundärkolonien in Tiefenwachstum waren bisher aus der Literatur nicht bekannt und konnten nur bei Bacillus subtilis nachgewiesen werden. Besonders ausgeprägt und in teils sehr kompakter rundlicher Form kamen diese

in Kolonien auf BPA nach 30 Tagen vor, während das Sekundärwachstum im oberflächig gelegenen Kolonieteil bereits starken Zerfall zeigte. In geringem Maße fanden sich kleine Sekundärkolonien auch in Tiefenwachstum von Kolonien auf BPA mit Chloramphenicol.

Bei Bacillus pumilus treten große Sekundärkolonien bevorzugt an der Basis oder unter der kompakten und stark verschleimten ehemaligen Deckschicht auf Letztere scheint dem Ein- bzw. Durchwachsen von Sekundärzellen beträchtlichen Widerstand entgegenzusetzen. Die Alterung der Sekundärkolonien erfolgt bei Bacillus pumilus in Übereinstimmung mit den Primärkoloniestrukturen frühzeitig, so daß bei der Entnahme nach 30 Tagen nur noch zerfallene Reste vorhanden sind.

Bacillus cereus (Glatt-Variante) weist im Schnitt erstmals nach 30 Tagen Sekundärkolonien auf. Zwei kompakte Sekundärkolonien von mittlerer Größe befinden sich in der linken Hälfte des Übersichtsbildes, von denen eine die Primärkolonieoberfläche aufgewölbt und geringfügig durchbrochen hat. Etwa in der Mitte des Schnittbildes befindet sich eine weitere Sekundärkolonie, die sich in quantitativer und qualitativer Hinsicht von sämtlichen übrigen Sekundärwachstumsbefunden unterscheidet. Sie entspricht der starken makroskopisch sichtbaren Aufwölbung und ähnelt in Form und Aufbau weitgehend einer frei auf dem Substrat gewachsenen symmetrischen Oberflächenkolonie aus erhabenem Koloniekörper und flachem, auslaufendem Zuwachsrand.

Auf den Primärkolonien von Bacillus mycoides (WgA, + 37° C) waren durchschnittlich je 6 größere aufgewölbte Sekundärkolonien von maximal 1,0 mm Durchmesser zu erkennen. Im Schnitt ist eine solche Sekundärkolonie, ihrer geringen Größe wegen wahrscheinlich nicht median, getroffen. Sie entspricht im Umriß dem makroskopischen Bild und weicht im Typus ebenfalls von der Mehrzahl der übrigen Befunde ab. Diese Sekundärkolonie zeigt bereits starke und damit frühzeitige Alterserscheinungen. Der überwiegende Teil befindet sich über der Oberfläche der Primärkolonie

und hat sich auf dieser ausgebreitet. Von der Basis der Sekundärkolonie reicht etwa kegelförmig ein Ausläufer aus stark zerfallenen Zellen undeutlich bis in die Mitte der Primärkoloniehöhe. Dieser Bereich dürfte der Mittelschicht der ersten Entnahme entsprechen, welcher große atypische und innerhalb der Schichten die zugleich am stärksten anfärbbaren Zellen enthielt. Von dort aus dürfte die Sekundärkolonie ihren Ausgang genommen und sich nach oben ausgebreitet haben. Ähnliche "aufsitzende" Sekundärkolonien von allerdings viel geringerer Ausdehnung fanden sich sehr vereinzelt lediglich noch bei Bacillus subtilis (BPA) (z.B. 5.2.1.6).

Die Bauelemente des Sekundärwachstums zeigten unterschiedliche Gestalt, aber übereinstimmend mit PREISZ (1904) u.a. dominieren atypische heteromorphe Zellen. Hinsichtlich des Umrisses und der Strukturierung unterschiedlicher Sekundärwachstumstypen als Funktion ihrer Bauelemente lassen sich dieselben Zusammenhänge erkennen, wie sie auch für Primärkolonien festzustellen waren. Nur sind diese für das Sekundärwachstum deutlicher und übersichtlicher, weil die Zeit zwischen Entstehung und Zerfall sowie die quantitative Ausdehnung im allgemeinen viel geringer sind als für primäre Kolonien.

Bacillus subtilis zeigt vielfach ein Nebeneinander vielfältiger Zellformen innerhalb einer Sekundärkolonie, die von fast normalen Zellen länglicher und zylindrischer Gestalt über keulenförmige, gekrümmte oder spindelförmige Zellen bis zu kokkoiden Elementen wechselnder Größe reichen, die HAAG (1927) als "hefeartig" bezeichnet.
Daneben gibt es Sekundärkolonien aus einheitlicheren Bauelementen, wie dies für solche im Übergang von Oberflächenwachstum zu tiefen wachstumsartigen Vorwölbungen charakteristisch ist, die sich meist stärker anfärben lassen. In Sekundärkolonien des eigentlichen Tiefenwachstums sind vielfach neben kokkoiden Elementen Ketten gekrümmter Zellen zu erkennen, die neben der Ausbreitungsbehinderung durch den umgebenden Agar zur Bildung rundlicher und kompakter, dicht ineinander verflochtener Zell-

aggregate führen.

Für Bacillus pumilus scheinen einheitlicher längliche Zellen ähnlich den primären vorzuherrschen mit der Neigung zur Bildung von Ketten, die bei Bacillus subtilis vor allem für die stark atypischen Zellformen weniger ausgeprägt war. Durch Kettenbildung können deutliche Wellenzüge von Zellsträngen entstehen. Trotzdem weichen aber die Sekundärzellen von der Norm ab, sind vielfach gekrümmt und von unterschiedlichem Durchmesser oder erscheinen mehr oder weniger deutlich kollabiert.

Der Aufbau der ausgedehnten Sekundärkolonie bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) ist auffällig einheitlich und unterscheidet sich von dem Gros der Zellen des diffusen Sekundärwachstums aus kurzen und rundlichen atypischen Zellen. Neben einem geringen Anteil an stark gealterten primären Zellen und Sporen besteht diese Sekundärkolonie aus einheitlichen schlanken Zellen, die allerdings mehr oder weniger gekrümmt und zu langen Ketten und Strängen verbunden sind. Durch dichte Lagerung sind diese etwa parallel und im Zentrum nahezu senkrecht ausgerichtet, um in den äußeren Teilen zunehmend schräg zu verlaufen und mit Wirbelbildungen zu enden.

Die mehr oder weniger aufrechte Ausrichtung der Zellstränge in dichter Anordnung erinnert an Strukturen der Mittelschicht von Primärkolonien und bewirkt in beiden Fällen starkes Höhenwachstum.

Reststrukturen und Andeutungen von längs- bzw. quergeschnittenen Zellsträngen sind auch noch in der oberflächig gelegenen Sekundärkolonie von Bacillus mycoides zu erkennen. Die länglichen Einzelzellen unterscheiden sich erheblich von den überwiegend atypischen und stark heteromorphen Zellen der Primärkolonie.

Unter zahlreichen Literaturangaben über den zellulären Aufbau der Sekundärkolonien berichten nur PREISZ (1904) und EISENBERG (1912) über

Sporenbildung in sekundären Zellen. Daraus ist auf ein seltenes Vorkommen dieser Erscheinung zu schließen, was unsere Befunde bestätigen.

Die Sporenbildung vegetativer Zellen ist an bestimmte Voraussetzungen gebunden (siehe auch 6.3), von denen vitale und normale Zellen neben dem Vorhandensein spezifischer Substanzen im Vordergrund stehen. Bei dem zellulären Aufbau des Sekundärwachstums aus überwiegend atypischen Bauelementen und den ungünstigen Ernährungsbedingungen in alternden Primärkolonien auf verarmten Substrat wird verständlich, daß im allgemeinen für Sekundärzellen sehr ungünstige Voraussetzungen zur Sporenbildung gegeben sind. Nicht immer war eine Entscheidung möglich, ob Sporen in Sekundärwachstum primärer Natur sind oder durch Versporung sekundärer Zellen entstanden. Eindeutig war deren sekundäre Natur für diffusen Sekundärwuchs und Sekundärkolonien bei Bacillus subtilis (BPA) (5.2.1.6) inmitten einer Umgebung aus primären freien Sporen und zerfallenen vegetativen Zellen. Es wurden nur nach Lokalisation, Form und Anfärbbarkeit eindeutig sekundäre Sporenmutterzellen berücksichtigt, welche die Sporen noch nicht freigegeben haben und des öfteren Zellketten bildeten.

In mehreren Schnitten der stark gealterten Sekundärkolonie von Bacillus mycoides waren nahe deren Oberrand vereinzelte Sporen zu finden, die auf Grund der Lage dieser Kolonie ebenfalls sekundärer Natur sein dürfte. Weniger deutlich war für Bacillus pumilus die Versporung einzelner Zellen in flachen und kleinen, sekundärkolonieartigen Zellansammlungen auf der ehemaligen Deckschicht (5.3.1.5).

Demnach ist vereinzelt die Bildung von Sporen in sekundären Zellen für drei der insgesamt vier Species mit Sekundärwachstum anzunehmen. Die betreffenden Zellen sind durchweg nicht von atypischer Gestalt und dürften als Varianten oder Mutanten mit verringerten Ansprüchen an spezifische versporungsauslösende Stoffe angesehen werden, die sich aber unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht anzureichern vermögen.

Aus unseren Befunden lassen sich folgende allgemeine Feststellungen in Hinsicht auf die Ursachen der Entstehung von Sekundärwachstum ableiten:

1) Erst nach dem Zeitpunkt ausgedehnter Versporung der Primärkolonien im Alter von etwa 10 Tagen ist für Bacillus subtilis, Bacillus pumilus und Bacillus cereus (Glatt-Variante) auf BPA makroskopisch wie mikroskopisch Sekundärwachstum festzustellen. Eine Ausnahme macht Bacillus mycoides (WgA, + 37°C), der schon nach 2 Tagen geringe Versporung aufwies (die aber zugleich bereits als maximal anzusehen ist) und dementsprechend früher als die anderen Species im Alter von 9 Tagen den Beginn von Sekundärwachstum erkennen ließ. Für den Beginn von Sekundärwachstum ist nicht das Koloniealter ausschlaggebend, sondern im Zusammenhang mit anderen Faktoren der jeweilige Entwicklungszustand der Kolonien.

2) Mit der Versporung der Zellen geht etwa vom sogen. 2. Makrokoloniestadium (siehe 6.2.2.2) eine starke Alterung des überwiegenden Teiles der unversporten Zellen einher, die mit dem Auftreten von atypischen Zellen sowie allmählichem Zerfall verbunden ist. Für Bacillus cereus (Glatt-Variante) erfolgt vergleichsweise zu den anderen Species eine deutlich langsamere Alterung bei insgesamt geringerer Versporung. Für die Entnahmen nach 20 bzw. 30 Tagen ist eine Abnahme von Sporen gegenüber der jeweils vorangegangenen Entnahme zu erkennen. Umgekehrt treten an die Stelle der Sporen zunehmend stark anfärbbare, rundliche bis gekrümmte und damit atypische Zellen, die sich von den primären und gealterten deutlich unterscheiden.

3) Bacillus mycoides (WgA, + 37°C) zeigt als einziger Keim Sekundärwachstum (in Form von einzelnen Sekundärkolonien) auch auf Weizengrießagar. Makroskopisch und in der Feinstruktur weichen die Primärkolonien stark von der Norm auf Bouillon-Pepton-Agar bei Zimmertemperatur ab als Folge des Zusammenwirkens schädigender Einflüsse von Mangelnährboden und erhöhter Bebrütungstemperatur. Nur wenige "normal" erscheinende Zellen dieser Kolonie sind zur Sporenbildung befähigt.

Aus diesen Feststellungen schließen wir auf einen Zusammenhang

zwischen gehäuftem Vorhandensein von Sporen und dem Auftreten von Sekundärwachstum bei Bacillus subtilis, Bacillus pumilus und Bacillus cereus (Glatt-Variante) auf BPA. Für diese Species nehmen wir eine Entstehung des Sekundärwachstums durch Auskeimen von Sporen der Primärkolonie an, wie es ähnlich von PREISZ (1904) für Bacillus anthracis ohne eingehendere Kenntnisse über die Feinstruktur von versporten Bacillenkolonien mit Sekundärwachstum vermutet wurde.

Die geringe Anzahl von sporadisch verteilten Sporen in den Kolonien von Bacillus mycoides (WgA, + 37° C) aus überwiegend atypischen Bauelementen läßt den vorstehend aufgeführten Zusammenhang zwischen ausgedehnter Versporung und Sekundärwachstum vermissen. Bacillus mycoides weicht hinsichtlich der Primärkolonien (zellulärer Aufbau) und der Sekundärkolonien (zellulärer Aufbau, Entstehungsweise und Form) von den entsprechenden Befunden bei Bacillus subtilis, pumilus und cereus auf BPA weitgehend ab. Deshalb nehmen wir für die Entstehung der Sekundärkolonien bei Bacillus mycoides in Anlehnung an LEWIS (1933, 1934) und STOLP (1958) spontan auftretende Mutantenzellen mit erhöhter Fähigkeit zur Nutzung unverbrauchter Nährstoffe an, die als Folge der Selektivwirkung des Mangelnährbodens zu einer beschränkten sekundären Kolonieentwicklung nach Alterung und Absterben der Primärkolonien befähigt sind.

Ähnlich wie für die Bildung von Sporen (siehe unter 6.3) sind auch die Kenntnisse über spezifische Substanzen, die ein Auskeimen der Sporen zu vegetativen Zellen und deren Weiterentwicklung bewirken, noch lückenhaft und teilweise widersprüchlich (HILLS 1949; JENSEN 1950/51, 1951/52; WINKLER 1956; THIMANN 1964). Die Sporen der einzelnen Species scheinen unterschiedliche Substanzen für das Keimen zu benötigen, wobei z.B. für Bacillus subtilis 1-Alanin + Adenosin Keimung der Zellen und Weiterentwicklung der Zellen bewirken, während bei Bacillus anthracis für eine Weiterentwicklung zusätzlich noch Glutaminsäure erforderlich ist. Neben zahlreichen komplexen Medien tierischer oder pflanzlicher Herkunft (JENSEN 1950/51, 1951/52) von breitem Wirkungsspektrum sollen

vor allem Glucose und einzelne Aminosäuren die Sporenkeimung bestimmter Species auslösen.

Unter der Voraussetzung, daß Sekundärwachstum auch durch Auskeimen von Sporen erfolgen kann, deutet dessen unterschiedlich starkes Auftreten bereits innerhalb einer Kolonie variable Ansprüche der einzelnen Sporen an, die quantitativer wie qualitativer Art sein werden. Möglicherweise trifft die bereits von BENECKE (1912) und HENRICI (1934) geäußerte Vermutung zu, daß Substanzen aus zerfallenden vegetativen Zellen oder aber zerfallenden Resten der Sporenmutterzellen bzw. von keimenden Sporen selbst ausgeschiedene Stoffe (POWELL u. STRANGE 1953) die Keimung bestimmter Sporen bewirken können. Die Annahme der Wirkung zerfallender Zellen würde dadurch gestützt, daß mit der Sporenbildung fast immer mehr oder weniger starke Alterung von Zellen bzw. deren Zerfall einhergehen.

Das überwiegende Fehlen von Sporen oder Resten primärer Zellen auch in lockeren und dadurch übersichtlichen Sekundärkolonien in einer Umgebung aus zahlreichen solchen Elementen läßt vermuten, daß ausgedehnte Sekundärkolonien nicht nur aus einer oder wenigen, sondern möglicherweise aus größeren Ansammlungen von Sporen und deren Auskeimung entstanden sind. Letzteres ist vor allem auch für das relativ einheitliche diffuse Sekundärwachstum bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) anzunehmen.

Für die unterschiedliche Ausdehnung des Sekundärwachstums werden dieselben Faktoren verantwortlich sein, die auch für primäres Wachstum begrenzend wirken, also Nährstoffmangel und der Einfluß von Stoffwechselprodukten. Die erhöhte Fähigkeit mutierter Zellen zur Nutzung unverbrauchter Nährstoffe schließt einen hemmenden Einfluß angehäufter Stoffwechselprodukte durch die Primärkolonien nicht aus, worauf auch LEWIS (1934) hinweist. Die Stärke dieses Einflusses auf sich teilende sekundäre Zellen jeglicher Art wird deutlich durch die überwiegend abweichenden und atypischen Zellformen mit der Tendenz zu früher Alterung und einer

praktisch fehlenden Fähigkeit zu erneuter Versporung.

Eine endgültige Beantwortung der Frage nach den Ursachen für das Auskeimen von Sporen in Primärkolonien zu Sekundärwachstum wird erst nach weiteren Untersuchungen 1) über die spezifischen Substanzen für eine Sporenkeimung und Weiterentwicklung der Keimstäbchen sowie 2) einer Analyse der Substanzen möglich sein, die in versporenden und zerfallenden Kolonien frei werden.

Die aus unseren Befunden abgeleiteten Möglichkeiten der Entstehung von Sekundärwachstum
1) durch Auskeimung von Sporen oder
2) durch Selektion mutierter Zellen
legt die Vermutung nahe, daß auch die von anderen Autoren beschriebenen Sekundärwachstumsphänomene nicht immer auf ein und dieselbe Weise entstanden sein brauchen.

6.5 Variabilität

Ein hoher Grad von Variabilität in den unterschiedlichsten Merkmalen ist für Bakterien und andere Mikroorganismen seit langem bekannt, und die Deutung und Erklärung vieler Variationsphänomene wurde erst durch die Fortschritte der Bakteriengenetik in den letzten Jahrzehnten möglich.

Die Musterung von Hunderten bewachsener Petrischalen während der Vorversuche und dem experimentellen Teil dieser Arbeit demonstrierte augenfällige Variationserscheinungen vor allem der Koloniemorphologie bei vielen Bakterienspecies. Da aber der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Erforschung der Feinstruktur charakteristischer Kolonieformen einiger Bakterienspecies liegt, mußte die eingehendere Berücksichtigung von Variationsphänomenen auf ein Minimum beschränkt bleiben. Im folgenden sollen lediglich zwei spontan aufgetretene Varianten von Bacillus cereus und der Einfluß der verwendeten Nährsubstrate sowie der Tempe-

ratur auf die Koloniemorphologie abgehandelt werden.

6.5.1 Spontane Variantenbildung

Bei zahlreichen Überimpfungen der Ausgangskultur von Bacillus cereus mit einheitlich rauhem Kolonietyp trat am Ende eines Impfstriches inmitten rauher Kolonien eine freistehende Kolonie auf, die schärfer begrenzt, erhabener und dementsprechend opaker war als die übrigen. Diese Form ließ sich auf BPA weitgehend einheitlich weiterführen und wurde als "Glatt-Variante" bezeichnet. Deren Kolonieentwicklung ist unter 5.5 bzw. 6.2. beschrieben.

Die Mikro- wie die Makrokolonie-Entwicklung dieser Variante entspricht auf BPA den typischen Glatt-Formen, führt zu erhabenen und relativ scharf begrenzten Kolonien von geschichtetem Aufbau und weicht damit von der rauhen Ausgangsform stark ab.

In den Stoffwechselleistungen der "BuntenReihe" stimmen dagegen die Rauh-Form und deren Glatt-Variante völlig überein und vermögen Glucose, Maltose und Trehalose zu vergären sowie Stärke zu hydrolysieren. Auffällig war die starke Beweglichkeit der Glatt-Varianten-Zellen, die denen der rauhen Form fehlt. Im Gegensatz zu den meisten übrigen Species besteht für die Kolonieentwicklung der Glatt-Variante auf BPA und WgA eine große Übereinstimmung und führt auf beiden Substraten zu Kolonien vom Glatt-Typ.

Das spontane Auftreten von R- aus S-Formen durch Mutation ist für zahlreiche Species bekannt (siehe auch 6.2.1) ebenso wie der umgekehrte Fall der Entstehung von S- aus R-Formen. Letzteres scheint besonders für Bacillen und Mycobakterien charakteristisch zu sein (HENRICI 1934), die bevorzugt als Rauh-Form wachsen. Im Rahmen unserer Untersuchungen ließen sich außer den unterschiedlichen morphologischen Befunden an den

Zellen und Zellverbänden beider Formen, die einen jeweils charakteristischen Kolonieaufbau bedingen, keine weiteren Abweichungen feststellen. Diese liegen allerdings (SCHLEGEL 1965) im Bereich des Möglichen, da morphologische visuell erfaßbare Eigenschaften von Mutanten vielfach mit biochemischen und anderen Merkmalen gekoppelt sind. Das einmalige Auftreten dieser Variante während zahlreicher Überimpfungen aus der hinsichtlich des Kolonietyps betont konstanten Ausgangsform läßt für die Entstehung der Variante eher auf eine spontane Mutation als die zufällige mechanische Isolierung einer bereits vorhandenen Mutante bei der Beimpfung schließen.

Spontan trat für die Glatt-Variante von Bacillus cereus eine weitere Variation auf, die erst im Alter von 2 Tagen deutlich zu erkennen war. Während die Kolonien auf WgA im allgemeinen weißlich-opak aussehen, traten auf diesem Substrat trübe-durchscheinende Kolonien von gleicher Gestalt wie erstere auf, die sich im Original auffällig voneinander unterschieden. Die neue Variante kam aber auch als Sektor unterschiedlicher Größe in Kolonien der Ausgangsform vor. Im Schnittbild ergaben sich für die Ausgangsform wie die Variante dieselbe Feinstruktur mit einem Aufbau aus 3 Schichten, wobei erstere in der Deckschicht starke Versporung aufweist, die der Variante bis auf wenige Sporen pro Schnitt fehlt. Demnach handelt es sich um eine sog. "asporogene" Variante, die wir nach dem makroskopisch auffälligen durchscheinenden Aussehen als "Hell-Variante" bezeichnet haben (siehe unter 5.5.2). Dieselbe Erscheinung konnte auch für Bacillus subtilis und pumilus auf BPA festgestellt werden (ohne weitere Beschreibung) und ähnelt den erhabenen Teilen der Kolonien von Bacillus subtilis auf BPA + 1,0 ‰ Chloramphenicol/ml (siehe 5.2.3)

In der Literatur finden sich verschiedentlich Angaben über asporogene Varianten üblicherweise sporenbildender Stämme von Bacillen. So beschrieben für Bacillus anthracis PREISZ (1904, 1911) und EISENBERG (1912) die Umwandlung sporogener Stämme in asporogene (durch Kultur bei + 42,5° nach PASTEUR während zahlreicher Passagen bzw. auf Glyzerinagar) sowie das spontane Auftreten asporogener Stämme. BEI JERINCK u. MINKMAN (1910) spontan aufgetretene Sektorvarianten von Bacillus

nitroxus, DOOREN de JONG (1931) sporenlose Mutanten von Bacillus megaterium aus Sekundärkolonien und SCHAEFFER et al. (1959) (nach WILSON u. MILES 1964) asporogene Varianten von Bacillus subtilis.

Übereinstimmend werden die Kolonien bzw. Kolonieteile asporogener Varianten als im Aussehen abweichend von den opaken Ausgangsformen beschrieben, deren Oberfläche auch vielfach durch Sekundärkolonien warzig uneben ist. Zumeist sind die Varianten anfangs normal, d.h. den Kolonien der Ausgangsform entsprechend, werden aber später "durchscheinend", "durchsichtig" oder "glasartig". Für die asporogene Variante der Glatt-Form von Bacillus cereus konnte dieses bestätigt werden. Noch auffälliger erfolgte das "Umschlagen" im Aussehen der Variantenkolonien bei Bacillus subtilis auf BPA, die zuerst eine einheitliche gelbweiße Farbe aufwiesen und opak aussahen, um frühestens nach 7 Tagen durchscheinend zu werden bzw. durchscheinende Sektoren bekamen.

Entgegen der Ansicht von v. ANGERER (1923), daß die Zellen in durchsichtigen Kolonien ohne Zwischensubstanz dicht aneinanderliegen, nennt EISENBERG(1912)die kompakten Sporen bzw. deren Hüllen als Ursache für das opake Aussehen versporter Kolonien. Sinngemäß bedingte dann das Fehlen der Sporen die Durchsichtigkeit unversporter Kolonien oder Kolonieteile. Nach unseren Feststellungen bei Bacillus cereus (Glatt-Variante), Bacillus subtilis und Bacillus pumilus sind die noch unversporten jüngsten Makrokoloniestadien mehr oder weniger opak, und diese Eigenschaft nimmt mit dem Alter der Kolonien und deren Versporung zu. Das starke Brechungsvermögen der Sporenhülle in Verbindung mit den intakten vegetativen Zellen bedingt die Opakität dieser Kolonien. Umgekehrt erscheinen bei völligem oder weitgehendem Fehlen von Sporen und dem mehr oder weniger starken Zerfall der vegetativen Zellen die Kolonien durchscheinend.

Im Schnitt waren für Bacillus cereus (Glatt-Variante) und Bacillus subtilis bei der jeweils ersten Entnahme nach dem makroskopischen Sichtbarwerden der "Hell-Variante" an reinen Kolonien wie an Sektoren keine Anzeichen

an den mehr oder weniger unversporten Zellen festzustellen, die auf eine Lyse unter Phageneinwirkung schließen lassen. Wie bereits angedeutet, waren unter den Zellen der asporogenen Varianten vor allem in Sektoren einzelne Sporen zu finden, so daß es sich nicht immer um eine absolute Asporogenität handelt. Deshalb darf ohne eingehende Untersuchungen der Kolonien nicht allein aus dem makroskopischen Befund "durchscheinend" auf völliges Fehlen einer Sporenbildung geschlossen werden. Diese in unterschiedlicher Anzahl noch vorhandenen Sporen sind wohl der Grund dafür, daß sich nach unseren Erfahrungen bei Abimpfungen von "Hell-Varianten" stets in wechselnder Zahl neben "asporogenen" Kolonien bzw. Sektoren auch wieder solche der Ausgangsform entwickelten.

EISENBERG (1912) nimmt für Bacillus anthracis die Existenz erblich fixierter sporogener wie asporogener "Rassen" an, die in den Kulturen entweder ein wechselndes Gemisch beider Anteile bilden oder selten rein vorliegen. Erhitzen des Impfmaterials führte durch die Abtötung der vegetativen Zellen zu einer Anreicherung der sporogenen Form (siehe auch CLAUS 1965). Der Autor erklärte die vielfach beobachtete Abnahme der Sporenbildung von Laborkulturen teilweise durch eine kumulierende Wirkung dysgenetischer Faktoren wie z. B. unbeabsichtigte Auslese asporogener Varianten, die obendrein in Mischkulturen durch früheren Beginn der Zellteilungen gegenüber den Sporen einen Entwicklungsvorsprung besitzen können.

Mit diesen Feststellungen bezüglich der Heterogenität von Bakterienkulturen und deren Wandelbarkeit z. B. durch Selektion vertritt EISENBERG einen Standpunkt, der erst später nach eingehenderen Kenntnissen über das spontane Auftreten von Mutationen allgemeinen Eingang gefunden hat. Allerdings wird die Quantität der Versporung einer Kultur auch von modifikativen Faktoren beeinflußt (siehe auch 6. 3), die vermutlich bei nachlassender Versporung bis zum völligen Fehlen bzw. bei quantitativ wechselnder Sporenbildung zuerst in Betracht gezogen wird (z. B. JUNGHANS 1953/54).

Nach neueren Untersuchungen wurden spontan auftretende asporogene Stämme von Bacillus subtilis eindeutig als Mutanten erkannt (SCHAEFFER et al. 1959; nach WILSON u. MILES 1964), und es gelang, durch Trans-

formation von DNS sporogener Stämme deren Sporenbildungsvermögen wiederherzustellen. A ber auch Phagen-Transduktion des Gens, das die Fähigkeit zur Sporenbildung bedingt, konnte für einen ehemals asporogenen Stamm von Bacillus subtilis nachgewiesen werden (TAKAHASHI 1969), während JACOB et al. (1960) vermuten, daß die Sporenbildung bei Bacillen unter episomaler Kontrolle stehen kann. Bereits DOOREN de JONG (1931) sah einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten sporenloser Mutanten von Bacillus megaterium und Phagenwirkung, aber erst LWOFF u. GUTMANN (1950) (nach WILSON u. MILES 1964) erkannten diesen Stamm als lysogen.

Die milchige Trübung des Weizengrießagars ermöglicht ein visuelles Erkennen von Stärkehydrolyse ("Amylolyse") als klaren Diffusionshof um die Kolonien ähnlich den Hämolysehöfen auf Blutagar. Es zeigte sich, daß die Kolonien der asporogenen Variante im Gegensatz zu denen der Ausgangsform auf WgA keine Höfe aufwiesen und demnach nicht zur Bildung von Amylase befähigt sind. Nach THIMANN (1964) handelt es sich bei den meisten Bakterien und Pilzen um α-Amylase, die z. B. auch für Bacillus subtilis nachgewiesen wurde.

Bei der beschriebenen sog. "Hell-Variante" der Glatt-Form von Bacillus cereus dürfte es sich um eine spontan aufgetretene Verlustmutante handeln, bei der Asporogenität und der Verlust der Bildung von Amylase miteinander gekoppelt sind.
Das Auftreten von Varianten als Sektoren ("Sektorvarianten" oder "Sektormutation" nach BEIJERINCK 1912) innerhalb Kolonien der Ausgangsform neben reinen Variantenkolonien wie im Fall von Bacillus cereus (Glatt-Variante) wirft die Frage nach der Entstehung dieser Erscheinung auf.

Aus der Literatur ist Sektorenbildung für zahlreiche Mikroorganismen, die in Kolonien wachsen, bekannt. Besonders häufig scheint diese neben Eubakterien bei den Actinomycetales (BEIJERINCK 1912; LIESKE 1921; WAKSMAN 1967) und Pilzen vorzukommen (HENRICI 1934; THOM u.

RAPER 1945; HAWKER et al. 1962), ist aber auch für Grünalgen wie Chlorella beschrieben worden (BEIJERINCK 1912).

Auf Gemeinsamkeiten von Sektoren und Sekundärkolonien wurde bereits unter 6.4 hingewiesen, die HENRICI (1934) als Charakteristika fortwährend unstabiler Kulturen ansieht. Als Ursache der Unstabilität dürften für Sektoren wie auch die Mehrzahl der Sekundärkoloniebildungen (siehe auch 6.4) überwiegend spontan auftretende Mutationen von Zellen sein, die dann am stärksten in Erscheinung treten, wenn sie mit visuell erkennbaren Veränderungen verbunden sind, die ihrerseits wieder mit Veränderungen der Stoffwechselleistungen u.a. einhergehen können (BLEUL 1962; SCHLEGEL 1965).

Während das Auftreten von Sektoren häufig beschrieben wurde, sind über den detaillierten Mechanismus ihrer Entstehung kaum Einzelheiten bekannt. HENRICI (1934) nimmt als Ausgang die Mutation einer Zelle des wachsenden Kolonierandes an, die fortwährend Zellen des neuen Typs hervorbringt, während sich die Kolonie vom Zentrum nach außen ausdehnt und aktives Wachstum nur an der Peripherie aufweist. Ähnlich äußert sich WAKSMAN (1967), der für das Entstehen von Sektoren bei Actinomyceten Mutantenzellen annimmt, die Klone genetisch gleicher Nachkommenschaft bilden.

Damit sind die wichtigsten Voraussetzungen für die Sektorenbildung das Auftreten abweichender und sich teilender Zellen mit überwiegend zentrifugaler Ausbreitung. Von Bedeutung dürfte bei diesem Prozeß vor allem die Trennung der beiden Komponenten und deren weiterhin getrenntes Wachstum nebeneinander sein, das makroskopisch scheinbar scharf abgegrenzt erfolgt.

Der Beginn des Auftretens abweichender Zellen und damit des Sektors kann aus dessen Lage in der Kolonie etwa abgeschätzt werden, der sich genau im Zentrum oder mehr oder weniger randwärts befindet. Bei diesen

Feststellungen auf makroskopischer Grundlage wird vorausgesetzt, daß eine eingetretene Mutation sofort zu abweichenden Zellen führt, die getrennt von der Ausgangsform in Erscheinung treten. Daß dies in mikroskopischen Dimensionen nicht immer auf diese Weise erfolgen muß, wird durch Befunde von KAPLAN (1953/54) angedeutet. Nach diesem Autor erfolgt für mutierte "diploid heterozygote" Zellen von Escherichia coli bei einem Teil erst die Trennung der Chromosomenpartner während des Koloniewachstums zu haploiden lac^+ und lac^- Zellen, die auf Indikatornährboden unterschiedlich gefärbte Sektoren ergeben. Die Mutation eines Gens kann aber auch zu einem vorübergehend metastabilen Zwischenstatus führen, der entweder zum mutierten stabilen Zustand oder zur Ausgangssituation "umklappt". Diesen Fall beschreibt KAPLAN für Serratia marcescens, wo nach mutagener Behandlung u. a. ein bestimmter Prozentsatz von Kolonien mit roten und weißen Sektoren erschien, deren Rate nach einer Pause zwischen Mutationsauslösung und Bebrütung deutlich zugunsten rein roter oder weißer Kolonien abfällt.

Im Schnittbild erscheint der Übergang zwischen sporogenem und asporogenem Kolonieteil relativ deutlich, aber oft unregelmäßig verlaufend voneinander abgegrenzt, wobei die Versporung für die Entnahmen im Alter von 2 und 10 Tagen gering auch in den Varianten-Teil herüberreicht.
Die Größe der Sektoren erweist sich nach eigenen Beobachtungen und Literaturangaben als sehr unterschiedlich. Beträgt die Ausdehnung eines Sektors mehr als die Koloniehälfte, so wird man u. U. im Zweifel sein, ob die Variante als Sektor in der Kolonie der Ausgangsform oder letztere als Sektor der Variantenkolonie anzusehen ist.

Nach der geometrischen Definition des Sektors als dem Teil des Kreises, der von zwei Radien und dem von ihnen ausgehenden Kreisbogen begrenzt wird, bleibt diese Entscheidung wohl dem Ermessen des Beschreibenden überlassen.

Wenn als Sektor oder dem Begriff "Sektorvariante" entsprechend durch Mutation bzw. genetisch bedingte Variation während der Kolonieentwicklung aus der Ausgangsform hervorgegangene Variantenzellen angesehen werden, sollte diese Erscheinung von anderen abgegrenzt werden, die vermutlich oder nachweisbar einen anderen Ursprung haben.

Vielfach sind auf dem Bewuchs von Impfstrichen abweichende quer oder unregelmäßig abgeteilte bzw. keilförmige Variantenansammlungen zu erkennen, die z.B. EISENBERG (1912) für Vibrio cholerae beschreibt und bei ULBRICH (1955) von Serratia marcescens abgebildet sind. In solchen Fällen handelt es sich wohl zumeist um die mechanische Trennung unterschiedlicher Komponenten von Mischpopulationen, die u.U. auch durch frühere Mutation bzw. genetisch bedingte Variation entstanden sind wie bei ULBRICH, wo es sich um eine Einzellkultur von Serratia marcescens handelt. Die sektorartig erscheinenden Teile der Impfstriche stellen mehr oder weniger dicht nebeneinander entstandene, sich behindernde und konfluierende oder überwachsende ehemalige Einzelkolonien dar, die in sich allerdings auch "echte" Sektoren im Sinne der genannten Definition enthalten können. Sektorartige Erscheinungen werden aber auch durch Mischungen unterschiedlicher Bakterienspecies bedingt. So bildet GRAY (1957) eine mit Vaginalexsudat beimpfte Petrischale ab, die u.a. die Kolonie eines nicht identifizierten Bakteriums enthält mit einem Sektor von Listeria monocytogenes, der durch die charakteristische Farbe und Konsistenz dieses Keimes sofort zu identifizieren ist. Nach Beobachtungen an Paradiphtheriestämmen mit sog. "Mischinfektsymptomen" bezweifeln auch BIERKOWSKI u. HACKENTHAL (1953/54), ob das Auftreten eines unterschiedlichen Keimes als Sektor in einem Kolonieverband stets als Wahrscheinlichkeitszeichen für einen Mutationsvorgang gewertet werden darf.

Als Abschluß dieser Betrachtungen zur Sektorenbildung sei bemerkt, daß bei zahlreichen Übereinstimmungen zwischen Sektoren und Sekundärkolonien unter Beschränkung auf die Fälle, in denen mutierte bzw. genetisch

veränderte Zellen den Ausgang darstellen, ein grundlegender Unterschied zwischen beiden Erscheinungen in deren zeitlichem Auftreten besteht. Sektoren entstehen als Teil wachsender und sich ausbreitender Kolonien in deren Wachstumsphase ("Nebeneinander"), auch wenn sie wie im Falle asporogener Sektoren erst später makroskopisch sichtbar werden. Sekundärkolonien hingegen treten überwiegend erst dann auf, wenn die primäre maximale Entwicklung der Kolonie bereits beendet ist ("Nacheinander").

6.5.2 Variabilität durch modifikative Einflüsse

Neben der erblichen Variabilität erfolgt auch für Bakterien eine deutliche Reaktion auf Änderungen der Umweltbedingungen, die nicht erblicher Art ist und als Modifikabilität bezeichnet wird (HARM 1955). Modifikativ wirken auf die Bakterienzellen und damit auch auf deren Kolonien vor allem unterschiedliche Nährsubstrate. Deren Einfluß auf die Koloniemorphologie und die Feinstruktur der Kolonien wurde neben der Kultur auf dem Standardmedium Bouillon-Pepton-Agar auch für Weizengrießagar sowie Bouillon-Pepton-Agar mit Chloramphenicol- bzw. Penicillinzusatz untersucht. Da für Bacillus mycoides starke Veränderungen in der Koloniemorphologie bei erhöhter Temperatur festzustellen waren, wurde die Kolonieentwicklung dieser Species zusätzlich auf BPA und WgA bei + 37° C untersucht.

6.5.2.1 Der Einfluß von Weizengrießagar

Weizengrießagar fand zuerst durch HEIDER (1892) (auf eine Anregung von R. KOCH hin) als Nährboden Verwendung, um für Bacillus anthracis eine rasche und reichliche Bildung von Sporen hoher Hitzeresistenz zu erhalten. REITER (1920) erhielt von Bacillus anthracis auf diesem Substrat bereits nach 2 Tagen Bebrütung bei + 37° C fast nur freie Sporen

und HENNEBERG u. WATERSTRAAT (1950/51) erwähnen für Bacillus subtilis nach 4 bis 5tägiger Bebrütung eine Versporung von 85 - 100%.

Einzelheiten über die Kolonieentwicklung, Feinstruktur der Kolonien und deren Versporung wurden ausführlich unter 5., 6.2 und 6.3 mitgeteilt, so daß an dieser Stelle die Besonderheiten für Weizengrießagar herausgestellt und zusammengefaßt werden sollen.

In den Mikrokolonien von Bacillus pumilus traten auf WgA anfangs ausschließlich (und geringfügig auch auf BPA) unseptierte "Zellfäden" auf, die sich aber mit zunehmendem Wachstum der Kolonie allmählich in Zellen unterteilten. Im Gegensatz dazu war diese abweichende Erscheinung für Bacillus cereus in den Mikrokolonien während des gesamten Beobachtungszeitraumes festzustellen, wohingegen die Makrokolonien im Schnitt deutlich aus Einzelzellen bestanden. WINKLER (1961) und THIMANN (1964) erwähnen derartiges Zellwachstum als häufig für die Latenzphase bzw. den Übergang von der Latenzphase zur logarithmischen Wachstumsphase, ohne daß dafür die Ursache bekannt ist. "Filamentöses" Wachstum kann aber auch auf Magnesiummangel beruhen (WEBB 1948, 1949, 1953; nach THIMANN 1964), da der Bedarf an Magnesium für grampositive Bakterien wie z.B. Bacillus subtilis und mycoides besonders hoch sein soll oder durch Penicillin-Einwirkung in unterschwelligen Dosen induziert werden. Penicillin verhindert dann die Zellteilung, während die Mureinsynthese nicht gehemmt wird (PELZER 1967).

In Übereinstimmung mit HEIDER (1892) war das Koloniewachstum auf WgA im allgemeinen geringer als auf BPA, und die Alterung und der Zerfall der Zellen erfolgte durchweg früher. Als Ursache für das geringere Wachstum und weitere Erscheinungen, die damit in Zusammenhang stehen, dürfte der geringe Gehalt des Weizengrießes an wichtigen Nährstoffen, vor allem Eiweiß, anzusehen sein, dessen genaue Zusammensetzung wie für andere komplexe Medien aus Naturstoffen nur unzureichend bekannt ist. Zusätzlich ist die Qualität des Weizengrießes Schwankungen unter-

worfen, die sich ausgeprägt für unterschiedliche Fabrikate äußerten, wenngleich für diese Untersuchungen stets dieselbe Sorte verwendet wurde (siehe unter 4.2.1). Wahrscheinlich hat der dominierende Anteil Stärke die geringste Bedeutung als Nährstoff, da zumindest bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) auch freistehende Variantenkolonien ohne Amylasebildung quantitativ gleich starkes Wachstum zeigten wie die amylasebildenden Kolonien der Ausgangsform.

In Zusammenhang mit dem geringeren und rascher beendeten Wachstum der Kolonien auf WgA steht der durchschnittlich frühere Beginn der Sporenbildung, der besonders deutlich für Bacillus subtilis, cereus und mycoides (Zimmertemperatur wie bei + 37° C) ausgeprägt war. Wenngleich auch eine im allgemeinen geringere Quantität der Versporung gegenüber BPA wegen des hohen Anteiles nicht versporender atypischer Zellen angenommen wird, sind Aussagen darüber ohne eingehendere quantitative und qualitative Untersuchungen nur sehr ungenau. Deshalb betrachten wir auch die Angaben von REITER (1920) und HENNEBERG u. WATERSTRAAT (1950/51) über "fast völlige" bzw. "85 - 100%ige" Versporung mit Zurückhaltung, solange Einzelheiten über den Anteil atypischer und nicht versporter normaler Zellen fehlen, die nach unseren Beobachtungen durch frühzeitigen Zerfall einen hohen Grad an Versporung lediglich vortäuschen können.

Eine eindeutige versporungsfördernde Wirkung von WgA war allerdings für Bacillus polymyxa festzustellen, der im Gegensatz zu der praktisch fehlenden Versporung auf BPA auf ersterem reichlich Sporen bildete. Obendrein entstehen durch starke Schleimproduktion aus Stärke relativ große Kolonien vom Glatt-Typ mit deutlicher Dreischichtung, die auch nach Zerfall der Bauelemente äußerlich völlig unverändert und erhaben erhalten bleiben.

Die auf WgA zumeist flacheren Kolonien waren im Typ nur bei Bacillus cereus und dessen Glatt-Variante sowie Bacillus mycoides (Zimmer-

temperatur) mit denen auf BPA übereinstimmend. Bacillus mycoides bildete sogar ausgeprägter abgesetzte Hauptstränge mit stärkerer Krümmung aus, womit die Angaben von PRINGSHEIM u. LANGER (1924) bestätigt werden. Bacillus pumilus und subtilis wuchsen dagegen abweichend von den betont glatten Kolonietypen auf BPA mehr oder weniger rauh und ließen dementsprechend einen differenzierten Aufbau aus Schichten vermissen. Hierbei wird der modifikative Einfluß des Substrates deutlich, der keinen genetisch bedingten Wechsel des Kolonietyps bewirkt, sondern nur vorübergehende Abweichungen, so daß nach Abimpfung von solchen Kolonien unter Standardbedingungen sofort wieder die charakteristische glatte Kolonieform erscheint.

Im Vergleich mit dem Koloniewachstum auf Bouillon-Pepton-Agar läßt sich für die insgesamt sehr unterschiedlichen Befunde eine Tendenz zu
a) geringerer Kolonieausdehnung und modifikativ rauhen Typen,
b) frühzeitiger Versporung,
c) gehäuftem Auftreten von atypischen Zellen und
d) frühzeitigem Zerfall der Kolonien
feststellen als Folge mangelhafter Nährstoffversorgung. Damit erscheint die Bezeichnung "Mangelnährboden" für Weizengrießagar berechtigt.

6.5.2.2 Der Einfluß der Temperatur

Die bereits in anderem Zusammenhang erwähnten Befunde von STÖSS (1958) über ein gegenüber unseren Feststellungen frühzeitigeres Auftreten von Koloniedifferenzierungen und dem Beginn der Sporenbildung für Bacillus subtilis und mesentericus beruhen auf der bekannten schnelleren Entwicklung vieler Species bei erhöhter Temperatur. Die forcierende Wirkung einer Temperatur von + 37° C gegenüber Zimmertemperatur konnte in Vorversuchen mit Ausnahme von Bacillus polymyxa für die übrigen untersuchten Formen bestätigt werden. Dabei ergaben sich aber nur für Bacillus mycoides auf BPA und WgA auffällige und extreme makroskopische wie mikroskopische Abweichungen von der Norm bei

Zimmertemperatur, die deshalb gesondert dargestellt werden sollen.

U.W. beschrieb bislang nur HOLZMÜLLER (1909) als einziger Autor die extreme Beeinflußbarkeit der charakteristischen rauhen Koloniformen von Bacillus mycoides durch erhöhte Temperaturen. Mehrere Stämme zeigten bei + 23°C die stärkste "Astbildung", während diese mit zunehmender Erhöhung der Temperatur abnahm, bei + 31°C bereits fehlte und bei + 35°C alle Kolonien als ein dichter, einheitlicher Belag erschienen, um höchstens am Rand kurze Auswüchse aufzuweisen. Als Ursache für diese Abweichungen erkannte HOLZMÜLLER eine mit steigender Bebrütungstemperatur zunehmende unregelmäßige Krümmung und Verbiegung der Zellketten, wodurch keine Parallellagerungen mehr möglich waren. Dieselben Befunde ergaben sich durch einen erhöhten osmotischen Wert des Nährbodens z.B. nach Zusatz von 2% NaCl.

Bacillus mycoides wird von maßgeblichen Autoren (SMITH et al. 1952) als Varietät von Bacillus cereus angesehen, die in physiologischen und morphologischen Eigenschaften nicht voneinander zu unterscheiden seien und sich experimentell ineinander überführen und stabil weiterkultivieren lassen. Demgegenüber zeigte nach KNIGHT u. PROOM (1950) Bacillus cereus für das Wachstum eine leichte Bevorzugung für die Temperatur von + 37° C gegenüber + 28° C, während Bacillus mycoides am besten bei + 28° C und nur spärlich oder garnicht bei + 37° C wuchs. PRINGSHEIM u. LANGER (1924) kultivierten Bacillus mycoides bei + 20 - 22° C und konnten auch noch bei + 30°C normales spiraliges Wachstum feststellen. Als optimale Temperatur für diese Species sieht PIEKARSKI (1940) + 30°C an, bei der auch die stärkste Sporenbildung erfolgte, während diese bei Zimmertemperatur nur gering war und bei + 36 - 40°C meist ganz ausblieb. Die optimale Temperatur für diese Stämme unterscheidet sich demnach von den Angaben HOLZMÜLLERs, wo bereits bei + 31° C die charakteristischen Stränge fehlten.

FORTNER (1951) bildet ohne diesbezügliche Beschreibung Mikrokolonien von Bacillus mycoides ab, die nach 2 Tagen bei + 37° C aus unregelmäßig verschlungenen und gekrümmten Zellketten bestehen und unseren Befunden ähneln. Eine bei HAWKER et al. (1962) abgebildete Makrokolonie im Alter von 2 Tagen nach Bebrütung bei + 37° C ist dagegen mit deutlich rechtswendigen spiraligen Ausläufern völlig normal entwickelt.

Aus diesen teils stark voneinander abweichenden Literaturangaben geht hervor, daß wohl die Mehrzahl der Stämme von Bacillus mycoides Temperaturen um + 22° C ("Zimmertemperatur") bevorzugt und bei diesen am deutlichsten den spiralig gekrümmten Kolonieaufbau zeigt. Aber die Abbildung bei HAWKER et al. deutet an, daß es auch Stämme gibt, die bei + 37° C zu diesem charakteristischen Wachstum befähigt

sind.

Der Begriff der "optimalen Temperatur" (siehe auch THIMANN 1964) ist ohne näheren Bezug relativ bedeutungslos, da für einzelne Merkmale oder Eigenschaften wie die Ausbildung gerader bzw. aberrant gekrümmter Zellen, daraus resultierende lockere und gekrümmte oder kompakt-glattähnliche Kolonieformen sowie die Quantität der Sporenbildung jeweils unterschiedliche optimale Temperaturen bestehen können.

Die Befunde an dem von uns untersuchten Stamm von Bacillus mycoides ergaben auf BPA wie WgA zu Beginn der Kolonieentwicklung kurze Ketten von etwa normaler und linearer Ausrichtung. Aber nach wenigen weiteren Teilungsschritten traten die ersten mehr oder weniger stark gekrümmten, gewellten oder abgeknickten und damit aberranten Zellen auf, die weiterhin dominierten. Damit werden die Angaben von HOLZMÜLLER (1909) bzw. die Abbildung bei FORTNER (1951) bestätigt. Auf WgA erschien die Mehrzahl der Zellen stärker aberrant zu sein als auf BPA, wodurch der schädigende Einfluß bzw. die geringe Eignung von WgA für die Kultur von Bacillus mycoides vor allem in Verbindung mit der erhöhten Bebrütungstemperatur unterstrichen wird. Ebenso war der Grad der Versporung bei + 37^{O}C auf WgA geringer und die Anzahl der extrem atypischen Zellen höher als bei dem Wachstum auf BPA.

Im Laufe der weiteren Kolonieentwicklung nach dem Mikrokoloniestadium waren die Zellen ebenfalls in der Form verändert, aber wegen der stark dreidimensionalen Verflechtung der Bauelemente, von denen im Schnitt jeweils nur Teile erscheinen, weniger gut zu beobachten. Auf beiden Substraten entstanden abweichend erhabene und kompakte Kolonien mit sehr dichter Lagerung der Zellen und Zellverbände, die in ihrer Feinstruktur völlig von den Befunden bei Zimmertemperatur abweichen. Die Kolonien ähneln im Typ makroskopisch wie mikroskopisch Glattformen und weisen zumindest auf WgA einen deutlichen Aufbau aus

3 Schichten auf. Trotz der anfänglich wirren Verflechtung der Zellketten tritt später eine Bildung von Zellsträngen ein, denen aber selbst Andeutungen der unter normalen Bedingungen gleichmäßigen parallelen Anordnung und Starrheit fehlen.

Von Interesse in Hinsicht auf die Beantwortung der Frage nach dem Mechanismus des Zustandekommens dieser aberranten Zellen durch erhöhte Temperatur ist der Hinweis von HOLZMÜLLER (1909), daß dieselben Erscheinungen unter NaCl-Einfluß entstanden. Ähnliche "abwegige" (WINKLER 1956) oder "heteromorphe" Bakterienformen (BARTMANN u. HÖPKEN 1956, 1963) entstehen durch den Reiz unterschiedlicher Noxen wie z.B. Salzen und Antibiotika, aber auch Strahlen und Temperatureinflüssen (WINKLER 1956).

Nach PELZER (1967) ist die Zellwand bzw. deren innerster quantitativ dominierender Teil (bei grampositiven Bakterien) aus Murein, der als "Stützschicht" bezeichnet wird, für die Formgebung der Zelle verantwortlich. Diese Stützschicht stellt einen allseits geschlossenen Hohlkörper dar aus einem einzigen Riesenmolekül. Für das Wachstum der Zelle müssen in diesem durch zelleigene lytische Enzyme Lücken geschaffen werden, damit in diese neue und vermehrte Bauelementen durch die Wirkung synthetischer Enzyme eingelagert werden können. Es ist bekannt, daß Enzyme gegenüber Temperaturen oberhalb des optimalen Wertes im allgemeinen empfindlich reagieren und denaturiert werden (THIMANN 1964). So wäre es auch für Bacillus mycoides bzw. bestimmte Stämme von diesem möglich, daß durch temperaturbedingte Schädigung des Enzymsystems der Einbau neuer Bauelemente in die Stützschicht gestört wird und durch den osmotischen Druck des Zellinnern aberrant geformte Zellen entstehen.

Die Schädigungen besitzen jedenfalls keine solchen Ausmaße, das Wachstum und die Teilung der Zellen sowie deren Sporenbildung zu verhindern, wenngleich letztere vor allem auf WgA quantitativ stark verringert ist.

Die eingetretenen Veränderungen durch erhöhte Temperatur sind nur modifikativer Art und dementsprechend reversibel, so daß sich die Zellen bei Zimmertemperatur wieder in der für die Rauhform von Bacillus mycoides typischen Weise vermehren und entsprechende Kolonien bilden.

Abschließend sei als Ergänzung zu den Angaben von SMITH et al. (1952) erwähnt, daß der von uns untersuchte rechtswendige Stamm von Bacillus mycoides Lactose zu vergären vermochte, nicht aber Glucose und Trehalose.
Bacillus cereus konnte dagegen Glucose und Trehalose, nicht aber Lactose vergären. Auch in diesen Eigenschaften besteht keine absolute Übereinstimmung zwischen den einzelnen Stämmen, womit zugleich die Variabilität der Organismen bestätigt wird.

6.5.2.3 Der Einfluß von Hemmstoffen

Die Kultur von 4 der untersuchten Bacillus-Species auf BPA mit Zusatz von Chloramphenicol bzw. Penicillin erfolgte in der Absicht, neben dem Mangelnährboden Weizengrießagar auch die Möglichkeit einer modifikativen Veränderung von Koloniemorphologie und -feinstruktur auf der Basis von Hemmstoffen zu untersuchen. Die einzelnen Formen besitzen gegenüber den Hemmstoffen ein unterschiedliches Verhalten, indem sie, wenn überhaupt, nur auf bestimmten und von Fall zu Fall wechselnden Konzentrationen zu wachsen vermögen. Da das Wachstum makroskopisch sichtbar auch zu unterschiedlichen Zeiten einsetzt, sind allgemeine und vergleichende Untersuchungen aller Formen in Entnahmeserien unterschiedlichen Alters nicht sinnvoll. Über Einzelheiten der Versuchsanordnung wurde bereits unter 4.2.4 berichtet.

Die Antibiotika wurden dem Standard-Nährboden in Konzentrationen beigefügt, die während Vorversuchen auf das Koloniewachstum eine deutlich

hemmende bzw. beeinflussende Wirkung hatten. Hinsichtlich der Beimpfung der Nährböden mit dem Multipunktator bestehen Unterschiede gegenüber der bei den Entnahmeserien geübten Praxis, indem die Fläche jedes Impfpunktes, der im Falle von Wachstum eine Kolonie ergibt, größer ist und pro Impfpunkt eine größere Menge von Sporen aufgebracht werden. So zeigten die Kolonien der Kontrolle auf BPA ohne Zusätze makroskopisch gewisse Abweichungen von denen aus Ösen-, Kapillar- oder Gußbeimpfung, die uns weniger auf der Quantität der aufgeimpften Sporen als auf der größeren beimpften Fläche für jede Kolonie zu beruhen schienen. Es fiel die Einheitlichkeit und ungefähre Übereinstimmung in der Größe für die inneren allseits gehemmten Kolonien auf. Im Schnittbild bestand dagegen für die Kontrollenbefunde völlige Übereinstimmung mit den durchschnittlichen Befunden aus den beschriebenen Entnahmeserien bezüglich der Feinstruktur.

In höheren als den in den Versuchen verwendeten Konzentrationen bewirkten beide Antibiotika für die untersuchten Species Bacillus subtilis, pumilus, cereus und mycoides totale Wachstumshemmung. Morphologische Veränderungen der Zellen durch Antibiotika sind vor allem für Penicillin bei gramnegativen wie grampositiven Bakterien beschrieben worden (KAFFKA 1955; FETTING 1957; BARTMANN u. HÖPKEN 1963), von denen die sog. L-Phase am meisten untersucht wurde.

Die geringsten Abweichungen von der Norm ergaben sich für Bacillus mycoides auf BPA + 1 I.E. Penicillin/ml. Es wurde die kleinste Kolonie der Petrischale untersucht, von der am ehesten ein Hemmeffekt äußerlich zu erwarten war. Aber der Aufbau im Schnitt, Tiefenwachstum und die Versporung stimmten völlig mit der Kontrolle und der Norm auf BPA überein.

Anders fielen dagegen die Befunde für die übrigen Species aus. Bacillus cereus auf BPA + 1,0 ‰ Chloramphenicol/ml bzw. 1 I.E. Penicillin/ml zeigten untereinander erhebliche Übereinstimmungen. Die Kolonie unter

Chloramphenicol-Einfluß ist relativ klein und befand sich von den benachbarten Kolonien so weit entfernt, daß durch diese kein hemmender Einfluß festzustellen ist. Sie zeigt einen gleichmäßigen Aufbau aus 4 Schichten und entspricht im Typ einer Glatt-Kolonie. Dagegen ist die größere Kolonie unter Penicillin-Einfluß flächig ausgebreitet und teilweise mit benachbarten fast konfluiert. Deshalb sind die Schnitthälften sehr unterschiedlich in der Höhe und in der Feinstruktur. Der den benachbarten Kolonien zugewendete Teil ist flach und einheitlich ungeschichtet, während der ungehemmte erhabene Teil einen Schichtenaufbau entsprechend der Kolonie unter Chloramphenicol-Einfluß aufweist.

Auch für Bacillus pumilus konnte die Wirkung beider Antibiotika verglichen werden. Auf BPA + 5 I.E. Penicillin/ml schienen die Kolonien vom Glatt-Typ zu sein und wichen wenig von der Norm ab. Im Schnitt zeigte sich dagegen ein auffällig undifferenzierter Aufbau aus stark versporten Zellsträngen, die mit flachen Wellenzügen vor allem in vertikaler Ebene verlaufen. Sie sind von gutem Erhaltungszustand, und die meist getroffenen Längsschnitte der Stränge deuten eine starke zentrifugale Ausbreitungstendenz an. Diese erklärt das Fehlen eines geschichteten Aufbaus mit Höhenwachstum. Makroskopisch und bedingt mikroskopisch ähneln diese Befunde denen von Bacillus pumilus auf BPA + 1,0 ‰ Chloramphenicol. Der Erhaltungszustand der Strukturen dieser Kolonie ist weniger gut. Trotzdem ist noch bei relativ flachem Aufbau eine deutliche Vierschichtung zu erkennen. Die Kolonie ist stark mit Schleim durchsetzt und maximale Versporung erfolgt in der Basalschicht. Beide Kolonien unter dem Einfluß unterschiedlicher Antibiotika weichen entgegen dem makroskopischen Bild erheblich von der Kontrolle und der Norm ab.

Bacillus subtilis sprach nur auf ein Antibiotikum an und wuchs auf BPA + 1,0 ‰ Chloramphenicol/ml im Gegensatz zu den anderen Species mit eigentümlich uneinheitlichen Kolonien aus flachen opaken und erhabeneren durchscheinenden Teilen . Im Schnitt ähnelten letztere den asporogenen

"Hell-Varianten" bei Bacillus cereus (Glatt-Variante) (siehe auch 5.5.2). Versporung war in diesen gering erfolgt, und vereinzelt fanden sich kleinere rundliche Sekundärkolonien aus stark atypischen Zellen. Die flächenmäßig überwiegenden flachen Kolonieteile waren aus 3 Schichten aufgebaut. Bei starker Alterung der Zellen erwies sich die Basalschicht als am stärksten versport. Diese Kolonieteile zeigten in der Schichtung gewisse Anklänge an die Norm auf BPA, während die proliferationsartig-erhabenen Teile völlig davon abwichen.

Es war auffällig, daß unter den Bauelementen sämtlicher untersuchter Kolonien, die unter Antibiotikum-Anwesenheit gewachsen waren und makroskopisch bis auf Bacillus mycoides mehr oder weniger stark von dem gewohnten Koloniebild abwichen, keine atypischen Veränderungen zu erkennen waren, die als Wirkung der Antibiotika zu deuten sind. Wenngleich infolge Alterung bereits der zelluläre Aufbau in manchen Fällen undeutlich war, ließen sich ausgesprochen atypische Zellen außer in den kleinen Sekundärkolonien von Bacillus subtilis nicht feststellen.

Alle Kolonien zeigten Versporung, deren Quantität allerdings unterschiedlich war. Wenn die Versporung als eine Eigenschaft intakter "normaler" Zellen anzusehen ist, spricht auch die deutliche Versporung gegen das Vorliegen geschwächter oder gehemmter Zellen, auch wenn dieses morphologisch nicht zu erkennen wäre. Die Lokalisation der Sporen weicht dagegen von der Norm auf BPA zumeist ab, indem sie bevorzugt in der Basalschicht erfolgt (siehe auch unter 6.3).

Nach der Beimpfung der Nährböden mit dem Multipunktator ergaben sich nach 1 Tag sehr unterschiedliche Bilder, indem entweder für Bacillus cereus unter Chloramphenicol-Einfluß jegliches Wachstum fehlte und erst nach 4 Tagen sichtbar wurde, bei anderen Formen einzelne Impfpunkte nicht bewachsen waren oder wie allein bei Bacillus pumilus unter Chloramphenicol-Einfluß sämtliche Impfpunkte Wachstum zeigten. Bacillus subtilis und pumilus unter Chloramphenicol-Einfluß wuchsen

im Gegensatz zu den übrigen Keimen nach 1 Tag in Form zahlreicher winziger "tautröpfchenartiger" Mikrokolonien auf dem Impfpunkt, die erst nachträglich zu mehr oder weniger einheitlichen Kolonien verschmolzen. Die Anzahl der von insgesamt 43 Impfpunkten ausgefallenen infolge totaler Hemmung war besonders für die miteinander verwandten Formen Bacillus cereus auf BPA + Chloramphenicol bzw. Penicillin mit 35 bzw. 32 und Bacillus mycoides auf BPA + Penicillin mit 19 beträchtlich hoch.

Es ist bekannt, daß in Bakterienpopulationen durch spontan aufgetretene Mutationen gegen Hemmstoffe verschiedenster Art resistente Mutantenzellen vorhanden sein können oder auch spontan entstehen. Resistenzmutationen sind häufig mit morphologischen Änderungen des Kolonietyps gekoppelt (STOLP 1958). Andererseits können bestimmte Bakterien wie z. B. Bacillus cereus das Enzym Penicillinase bilden, das Penicillin hydrolisiert und so Wachstum auch auf einem ursprünglich penicillinhaltigen Substrat ermöglicht (THIMANN 1964).

Zusammenfassend lassen sich folgende Feststellungen treffen:

1. Abweichende, atypische oder heteromorphe Zellen, deren Entstehung auf einen Hemmstoffeinfluß schließen läßt, waren in den Kolonieschnitten nicht nachzuweisen.

2. Die Feinstruktur der Kolonien und deren Bauelemente entsprachen solchen Befunden, wie sie von nicht hemmstoffhaltigen Substraten bekannt sind.

3. Mit Ausnahme von Bacillus mycoides weichen die Koloniemorphologie und die Feinstruktur von den artspezifischen Gegebenheiten auf BPA mehr oder weniger ab. Beim Wachstum auf chloramphenicol- bzw. penicillinhaltigem Substrat bildete Bacillus cereus betont glatte Kolonien, während für Bacillus subtilis in Anwesenheit von Chloramphenicol sektorartige Kolonieteile ähnlich asporogener Varianten auftraten.

4. Das Koloniewachstum von Bacillus subtilis und pumilus bei Anwesenheit von Chloramphenicol beginnt allmählich in Form winziger zahlreicher Mikrokolonien auf jedem Impfstrich, die erst nachträglich zu kompakten Kolonien verwachsen. Für die übrigen Species fällt das Wachstum auf zahlreichen Impfpunkten völlig aus, was eine Selektion andeuten könnte.

Aus diesem Befunden schließen wir auf eine Entstehung der in Anwesenheit von Antibiotika gewachsenen Kolonien aus resistenten spontan entstandenen Mutantenzellen, die durch die Hemmstoffe selektiert wurden.

6.6. Die Bakterienkolonie als biologische Einheit.

Nachdem die Darstellung der Befunde bislang weitgehend auf Einzelheiten der Feinstruktur und die Bauelemente ausgerichtet waren, liegt es nahe, abschließend auch das Koloniewachstum von Bacillen und anderen Bakterien in seiner Gesamtheit zu betrachten.

Wenn bisher und weiterhin von Bakterienkolonien im allgemeinen berichtet wurde, sind damit stets Oberflächenkolonien auf einem festen Substrat bei Eubacteriales gemeint. Diese Art des Wachstums von einem Initialpunkt aus unter zentrifugaler Ausbreitung bei mehr oder weniger starkem Zusammenhalt der Zellen zur etwa radiärsymmetrischen Kolonie ist aber keine auf diese Ordnung beschränkte Eigentümlichkeit, sondern vielmehr auch für Actinomycetales und Chlamydobacteriales, Cyanophyta, Fungi und einzellige Chlorophyceen bekannt.

Koloniebildungen von makroskopisch sichtbarer Größe kommen für Bakterien unter günstigen Umweltbedingungen auch in der Natur vor (BISSET 1955; HENNEBERG 1957). Neben einem geeigneten feuchten Substrat, als das z.B. nach Beobachtungen von EIJKMAN (1906) auch menschliche Fäces dienen können, ist vor allem eine hohe relative Feuchte der umgebenden Luft von Wichtigkeit, die unter Laborbedingungen durch die Wirkung der üblichen Petrischalen als "feuchte Kammern" gegeben ist.

Wenn von verschiedenen Autoren wie BENECKE (1912) und BISSET (1955) angedeutet wurde, daß Bakterienkolonien auf künstlichen Nährböden ebenfalls Kunstprodukte oder "erzwungene Wuchsformen" darstellen, so besteht zu Schlüssen daraus auf eine verminderte Aussagekraft der Be-

funde, die an solchen Kolonien gewonnen wurden, kaum Anlaß. Wenngleich z.B. empfindliche Keime der Darmflora hohe Ansprüche an das Substrat und andere Kulturbedingungen stellen, die bisweilen noch nicht bekannt sind und deshalb für diese eine optimale dauerhafte Kultur nicht möglich ist, sind die Mehrzahl der anspruchsloseren Formen auf vielen der gebräuchlichen Nährböden unter "künstlichen" Bedingungen sicher günstigeren Verhältnissen ausgesetzt als an den natürlichen Orten ihres Vorkommens unter Konkurrenz anderer Formen. Deshalb brauchen die auf diese Weise gewonnenen Befunde nicht in Frage gestellt zu werden.

Von besonderer Bedeutung vor allem in Hinsicht auf die Nährstoffversorgung als eine Voraussetzung für das Wachstum ist der Mechanismus des Stofftransportes innerhalb der Bakterienkolonien. Während bei oberflächlicher Betrachtung zwischen Bakterienwachstum in flüssigen bzw. auf festen Substraten die quantitativen und morphologischen Besonderheiten zuerst auffallen, sind von größerer Bedeutung die physiologischen Verhältnisse, die sich aus einer Anhäufung von Zellen auf engem Raum ergeben, von denen nur die unterste Schicht mit dem Substrat in Kontakt steht. Für Bakterienwachstum in Flüssigkeiten erfolgt durch aktive Bewegung der Keime selbst sowie Strömungen und Bewegungen des flüssigen Substrates ein Heranführen von Nährstoffen und Ableiten von Stoffwechselprodukten in dem Rahmen, der durch die Quantität und Qualität des Substrates abgesteckt ist. Eine "Ideallösung" in diesem Sinne stellt der Chemostat dar, in welchem durch kontinuierliche Erneuerung der Kulturflüssigkeit ein konstantes Wachstum der Kultur bzw. das Verbleiben der Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase erreicht werden kann.

Auf festem Substrat entsprechen den vorgenannten Gegebenheiten höchstens bedingt die ersten Mikrokoloniestadien, wenn die Zellen je nach Wassergehalt des Substrates in dem Flüssigkeitsfilm der Oberfläche liegen. Aber schon mit der Ausbildung einer zweiten Schicht ändern sich für diese durch den fehlenden Kontakt der Zellen mit dem

Substrat die Bedingungen für die Stoffaufnahme und -abgabe grundlegend, worauf SCHUBERT (1920) ausdrücklich hinweist. Für junge wachsende Kolonien von Species, deren Zellen keine ausgeprägte Schleimproduktion aufweisen, sind in den Mikro- wie Makrokolonien selbst bei dichtester Lagerung "interzelluläre" Lücken vorhanden, die kapillar mit Flüssigkeit erfüllt werden. Bei den meist geringen Ausmaßen dieser Hohlräume dürfte die kapillare Saugkraft relativ hoch sein und auch für stark aufgewölbte Bakterienkolonien ausreichen.

Von Bedeutung ist deshalb die Art des Kontaktes von basaler Zellschicht und Substrat, dem HENNEBERG u. WOLFF (1963) eine Studie gewidmet haben. Bei rauhwachsenden Kolonien von Mycobacterium tuberculosis kann über weite Flächen der direkte Kontakt der Zellen mit dem Substrat fehlen, so daß sich zwischen Kolonie und letzterem ein flüssigkeitserfüllter Raum befindet. Umgekehrt stellten diese Autoren für Pseudomonas aeruginosa eine etwa senkrechte, palisadenartige Ausrichtung der Stäbchenzellen über die gesamte basale Fläche der Kolonien fest, die eng dem Nährboden auflagen. Denselben engen Kontakt fanden wir für alle von uns untersuchten Kolonien von Bacillen, die in einigen Fällen wie Bacillus mycoides durch Tiefenwachstum besonders fest mit dem Substrat verbunden sind.

Über die kapillar gehaltene Flüssigkeit in den Kolonien und den Oberflächenfilm des Substrates wird ein Austausch gelöster Stoffe zwischen beiden durch Diffusion möglich, die über kleine Strecken, wie sie für die Höhenausdehnung von Bakterienkolonien vorliegen, mit relativ großer Geschwindigkeit erfolgt. Dieses dreidimensional zu denkende "Flüssigkeitsnetz" vermag auch die äußersten Zellen der Deckschicht zu erreichen. Dabei findet ein Stofftransport durch Konzentrationsausgleich in zwei Richtungen statt, indem von den Zellen ausgeschiedene Enzyme in das Substrat und umgekehrt primär aufnehmbare bzw. durch die Enzyme aufgeschlossene Substanzen in die Kolonie wandern. MÜLLER (1950) nimmt ein vermehrtes Aufsteigen von Nährlösung in die Kolonie durch

oberflächige Verdunstung von Wasser an. Wegen der hohen relativen Feuchte in den Kulturschalen bei nicht ausgetrocknetem Substrat ist dies aber sicher unwesentlich und könnte wegen der erforderlichen Enzymabscheidung in das Substrat und einer eintretenden Erhöhung des osmotischen Wertes durch Wasserverdunstung sogar nachteilig werden.

Da in dichteren Medien die Diffusion langsamer verläuft, wird durch die Schleimbildung intakter Zellen, die allerdings automatisch mit einer Verringerung des quantitativen Anteiles an zu versorgenden Zellen im Vergleich zu einer gleichgroßen nicht schleimhaltigen Kolonie einhergeht, die Diffusionsgeschwindigkeit herabgesetzt werden. In noch stärkerem Maße wird dies der Fall sein, wenn infolge Alterung besonders die Zellen des basalen Bereiches schleimig zerfallen oder sogar durchgehende komprimierte Zerfallsschichten vorliegen, durch die hindurch der Stofftransport in wachsende oder versporende Zellen erfolgen muß. Diese Überlegungen deuten beträchtliche Erschwernisse für den Stoffaustausch besonders in älteren Kolonien an, die einen wesentlichen Nachteil für das Wachstum von Zellen auf festen Substraten gegenüber Flüssigkeitskulturen darstellen. Allerdings wird umgekehrt in Oberflächenkolonien für streng aerobe Formen eine bessere Versorgung mit Sauerstoff möglich sein. Soweit uns bekannt ist, fehlen bislang gezielte Untersuchungen über den Stofftransport in Bakterienkolonien, die mit Hilfe von Vitalfarbstoffen erfolgen können und besonders in Zusammenhang mit Fragen nach der lokalisierten Sporenbildung von Interesse sind.

Schon frühzeitig wurden teilweise phantasievolle und unwissenschaftliche Theorien über die besonderen Qualitäten von Bakterienkolonien als "Zellstaat", "vielzellige Organismen" oder hochdifferenzierte Gebilde nach der Art von Teilen höherer Pflanzen kritiklos veröffentlicht (z.B. MÜNDEN 1899; SAUL 1900, 1901; SERKOWSKI 1901). Dem stehen Autoren wie GOTSCHLICH (1929) gegenüber, die zelluläre Differenzierungen innerhalb von Bakterienkolonien verneinen und letztere lediglich als Anhäufung gleichartiger, zusammenhangloser Individuen ansehen.

Wir möchten der Ansicht von KORINEK (1934/35) zustimmen, daß Bakterienkolonien auf festen Substraten "Zellgemeinschaften eigener Art" darstellen, die weder als regelloser Zellhaufen noch als (im allgemeinen) Zellverband höherer Ordnung betrachtet werden können. Anzeichen von Arbeitsteilung, die z.B. für höher entwickelte Zellkolonien von Grünalgen (Volvocales) mit einer Differenzierung in vegetative und generative Zellen einhergeht, sind für Bakterien nicht nachgewiesen worden. Überhaupt dürfte der Versuch, Übereinstimmungen z.B. zwischen Bakterienkolonien und differenzierten Zellaggregaten oder Coenobien, wie sie für viele Algen unterschiedlicher Verwandtschaftsgruppen vorkommen, ungerechtfertigt sein, da es sich um grundsätzlich qualitativ voneinander abweichende Erscheinungen handelt. Analogien können dagegen zwischen einfachen Aggregationen von Bakterien und anderen Mikroorganismen bestehen, die durch bestimmte gleichbleibende und spezifische Teilungsmodi und ein Zusammenbleiben der Zellen nach der Teilung bedingt sind wie z.B. für Diplococcus oder Sarcina bzw. die Cyanophyceen Chroococcus oder Eucapsa (SCHUSSNIG 1960).

Besonderheiten vor allem der Feinstruktur von Bakterienkolonien legen Vermutungen nahe über eine vorübergehende Abnahme an Individualität für jede Einzelzelle mit deren Einordnung in das Gesamtgefüge der Kolonie, die eine hochgradige gegenseitige Beeinflussung der Zellen mit komplexen Wechselwirkungen über die kapillaren Flüssigkeitswege bedingt. Um zu detaillierten Einblicken in diese Zusammenhänge zu kommen, sind spezielle Untersuchungen erforderlich.

An dieser Stelle muß das Phänomen der Bakterienkolonien genannt werden, die befähigt sind, sich auf der Substratoberfläche fortzubewegen. Fortbewegungen von Einzelzellen oder kleinen Zellverbänden sind für begeißelte Bakterienspecies auf feuchten Nährböden möglich. Aber im erstgenannten Fall sind es makroskopisch sichtbare Bakterienkolonien wahrscheinlich mit einem Aufbau aus zahlreichen parallelen Schichten, die sich geordnet als Ganzes mit Hilfe der Geißeln ihrer basalen Zellen bewegen bzw. fortbewegen.

Die erste Beschreibung solcher Bakterienkolonien stammt von MUTO (1903). In den letzten Jahren hat sich neben anderen Autoren besonders GILLERT (1956, 1957, 1958, 1962, 1963) um die Erforschung dieser Erscheinungen bemüht und selbige auch im Film festgehalten. Wandernde bzw. rotierende Bakterienkolonien sind wahrscheinlich auf eine untereinander eng verwandte Gruppe sporenbildender Formen um Bacillus circulans beschränkt. Während der Wanderung bzw. der Rotation auf der Substratoberfläche vermögen die Kolonien ihre Form zu ändern und Teile abzugliedern oder umgekehrt andere Kolonien oder Teile davon aufzunehmen und in ihr eigenes Gefüge einzuordnen.

Am auffälligsten ist das Zusammenbleiben der Bakterien in einer regelmäßigen Anordnung während der Bewegung, das auf eine gesteuerte Übereinstimmung des Verhaltens der Einzelzellen schließen läßt. Die Fähigkeit solcher Kolonien, als Ganzes mit der Fortbewegung zugleich unverbrauchtes Substrat zu erreichen, ist völlig einmalig. Eine Gesamtdeutung dieser vielfältigen Erscheinungen ist bisher noch nicht gelungen. Sie stellen wohl einen Extremfall gleichgerichteten Zusammenwirkens von Bakterienindividuen innerhalb einer Kolonie dar, der gleich oder ähnlich für andere Bakterien nicht bekannt ist. Damit scheint für die Bacillus circulans-Gruppe eine höhere Stufe der Kolonieentwicklung vorzuliegen auf der Basis der Aggregation von Einzelzellen zu einem geordneten und synchron reagierenden Verband, der aber zugleich durch mechanische Eingriffe oder infolge Alterung und Zerfall nach Versporung wieder aufgelöst werden kann und damit auf die Stufe des Einzelindividuums ohne dessen Schädigung zurückzukehren vermag.

Wenn auch für die von uns untersuchten Species z. B. die Ursachen bestimmter Unregelmäßigkeiten im Kolonieumriß oder auffällig gestalteter Kolonieoberflächen nicht erkannt werden konnten, ermöglicht die vergleichende Betrachtung von Mikro- und Makrokolonien unterschiedlicher Formen grundsätzliche Einblicke in den Mechanismus der Kolonieentwicklung (siehe unter 6.2), die teilweise auch von allgemeiner Gültigkeit sein werden. Danach versuchen wir, die Arbeitshypothese von HENNEBERG

(1955, 1957) über die "Bakterienkolonie als organisiertes Gebilde", dem ein Organisationsplan zugrunde liegt, folgendermaßen zu interpretieren: Für mehrere Species der Gattung Bacillus zeigen die Kolonien einen Aufbau, der jeweils für rauhe bzw. glatte Kolonietypen im Prinzip übereinstimmt, aber spezifisch abgewandelt wird. Als Alternative zu einem möglichen "ungeordnet" erscheinenden Aufbau sind diese Kolonien "organisiert", wobei Organisation nicht als vorgegebenes, genetisch fixiertes und spezifisches Entwicklungsschema angesehen wird, sondern aus dem Zusammenspiel von spezifischen Eigenschaften der Zellen und mechanischen sowie physiologischen äußeren Faktoren entsteht.

Das Wachstum von Bakterien in Form von Kolonien auf festem Substrat sehen wir als eine Möglichkeit von mehreren an, das zahlreichen Einflüssen endogener wie exogener Art unterworfen ist. Wegen der hohen Generationsfolge wachsender Bakterienkolonien, deren durchschnittliche Anzahl von Zellen nach der logarithmischen Wachstumsphase auf etwa 10^8 bis 10^9 (KAPLAN 1953/54) angenommen werden kann, treten spontan Mutationen stärker als bei Organismen mit geringerer Generationsfolge in Erscheinung. Diese erklären neben anderen Arten genetisch bedingter Variation und modifikativen Einwirkungen die auffällige Variabilität bei Bakterien, welche sich vielfach auch makroskopisch im Koloniebild äußert und bei der zweifelsohne vorhandenen Spezifität vieler Merkmale der äußeren Kolonieform und des Feinbaues auch starke Abweichungen davon bedingen können (z.B. R- und S-Formwechsel). So stellen Bakterienkolonien auch als Einzell- bzw. Einsporkulturen genetisch heterogene Populationen dar (STOLP 1958), die nicht Klonen entsprechen. Ihre physiologischen und morphologischen Eigenschaften sind Durchschnitts- oder Gesamtleistungen (HENNEBERG 1957), die einzeln zumeist erst durch Selektion und Anreicherung in Erscheinung treten.

Nachdem durch R. KOCH brauchbare Verfahren zur "Reinkultur" von Bakterien in Form von Kolonien auf festen Nährböden eingeführt worden

waren und damit auch die "Konstanz der Art" für Bakterien bestätigt wurde, stellen die Erkenntnisse über eine bedingte Wandelbarkeit von Bakterienstämmen auf genetischer Basis eine Revision der Vorstellung von der Uniformität der Bakterienkolonie dar, ohne damit ersteren Grundsatz zu widerlegen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

1. Für Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus cereus, Bacillus cereus (Glatt-Variante), Bacillus mycoides und Bacillus polymyxa wurden Oberflächenkolonien bei Zimmertemperatur in jungen Stadien (Mikrokolonien) lebend und in älteren Stadien (Makrokolonien) an Hand von medianen Vertikalschnitten auf Bouillon-Pepton-Agar und Weizengrießagar bei Zimmertemperatur untersucht. Weiterhin wurden auf beiden Substraten Kolonien von Bacillus mycoides, die bei + 37° gewachsen waren sowie einige der genannten Species auf Bouillon-Pepton-Agar mit Zusatz von Chloramphenicol bzw. Penicillin im Schnitt untersucht.

2. Die Kolonien der genannten Species erwiesen sich im Alter zwischen 1 und 35 Tagen für die Herstellung von Vertikalschnitten nach Einbettung in Paraplast als geeignet.

3. Die Feinstruktur der Kolonien läßt eine Einteilung in Glatt-Typen mit Schichtenaufbau und in vertikaler Ebene gewellten Zellsträngen bzw. in Rauh-Typen mit geringerer Differenzierung und in horizontaler Ebene gewellten Zellsträngen zu.

4. Auch im Mikrokoloniestadium ergeben sich Unterschiede, indem die Glatt-Typen Zellketten aus meist kurzen Bauelementen bilden, die leicht zerfallen, während bei Rauh-Typen lange und starre Zellketten aus länglichen Zellen mit geringer Neigung zum Auseinanderbrechen entstehen. Dementsprechend entstehen aus den Zellen und Zellketten der Glatt-Typen zuerst einschichtige Mikrokolonien, die vom Zentrum her weitere Schichten nach oben drücken. Die Mikrokolonien der Rauh-Typen sind aus langen Zellketten in unregelmäßiger Verschlingung und Überlagerung oder starren, parallel gelagerten und sich zentrifugal ausbreitenden Zellsträngen aufgebaut.

5. Besondere Aufmerksamkeit galt der Koloniebildung von Bacillus

mycoides. Die dominierend rechtswendige Krümmung der Zellketten wird auf Krümmungen der Zellen selbst sowie auf meist nur geringfügiges Abknicken der Zellen innerhalb einer Zellkette zurückgeführt. Eine Erklärung für die bedingt konstante Hauptkrümmungsrichtung der Zellstränge konnte nicht gegeben werden.

6. Die Sporenbildung beginnt zumeist lokalisiert in den oberen Kolonieteilen und nur unter Hemmstoffeinfluß auch bevorzugt in der Basalschicht.

7. Sekundärwuchs tritt bei einigen Species diffus wie in Form kompakter Sekundärkolonien auf. Dessen Entstehung wird entweder durch Auskeimung von Sporen oder für Bacillus mycoides auf Weizengrießagar durch Selektion von Mutantenzellen erklärt. Sekundärkolonien konnten besonders ausgeprägt auch für Bacillus subtilis im Tiefenwachstum festgestellt werden.

8. Im Vertikalschnitt wurde eine spontan aufgetretene Verlustmutante von Bacillus cereus (Glatt-Variante) untersucht, bei der Asporogenität mit dem Verlust zur Bildung von Amylase gekoppelt war.

9. Weizengrießagar bewirkte zahlreiche Abweichungen von der Norm auf Bouillon-Pepton-Agar wie Neigung zum Wachstum als Rauh-Form, gehäuftes Auftreten atypischer Zellen und frühzeitige Alterung.

10. Bis auf Bacillus mycoides zeigten alle auf antibiotikumhaltigem Agar gewachsenen Kolonien makroskopisch wie in der Feinstruktur mehr oder weniger starke Abweichungen, ohne daß atypische Zellen erkannt wurden, die auf Antibiotikum-Einfluß schließen lassen. Es wird eine Entstehung der Kolonien aus Resistenzmutanten vermutet.

11. Die Kultivierung von Bacillus mycoides bei + 37° gegenüber Zimmertemperatur bewirkte bei dem untersuchten Stamm stark aberrante Zellformen, die eine Änderung der sonst typischen Rauh-Form bewirken.

12. Für den Mechanismus der Kolonieentwicklung wurden bei den untersuchten Species folgende Faktoren in komplexem Zusammenspiel als wirksam erkannt:

a) Größe, Form und Bekapselung der Einzelzelle in Abhängigkeit von der jeweiligen Entwicklungsphase und den Kulturbedingungen,

b) Grad des Zusammenhaltes der Einzelzellen nach der Teilung und der Starrheit der entstehenden Zellketten,

c) Reibungswiderstand zwischen Substratoberfläche und Kolonie sowie zwischen den Zellen und Zellverbänden innerhalb der Kolonie selbst,

d) zentrifugal wie zentripetal wirksame Kräfte in bezug auf den Initialpunkt der Kolonieentwicklung,

e) Einfluß von Nährstoff- und Stoffwechselprodukt-Konzentration auf Wachstumsintensität, Form und Alter der Zellen,

f) Unterschiede in der Stoffzuführung bzw. -ableitung innerhalb der Kolonie.

13. Die Befunde für die untersuchten Species werden innerhalb der genetisch und modifikativ bedingten Breite der Variabilität als spezifisch angesehen und lassen einen organisierten Aufbau annehmen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

ANGERER, K. v.: Über das optische Verhalten der Bakterien. Arch. Hyg. 93, 14-25 (1923).

AXELRAD, C.: Über Morphologie der Kolonien pathogener Bakterien. Zschr. Hyg. 44, 477-497 (1903).

BARTMANN, K.; HÖPKEN, W.: Zur Heteromorphie der Bakterien. In: HENNEBERG, G. (edit.) Bildatlas pathogener Mikroorganismen. Bd. II. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart 1963.

BAUMGÄRTEL, T.: Grundriß der theoretischen Bakteriologie. Verlag J. Springer, Berlin 1924.

BAYER, J.: Über den mikroskopischen Aufbau von Bakterienkulturen. Inaugural-Diss., Inst. für bakter. Hygiene der Tierärztlichen Hochschule in Wien 1921.

BEIJERINCK, M. W.: Mutationen bei Mikroben. Folia Mikrobiol. 1, 4-100 (1912).

BEIJERINCK, M. W.; MINKMAN, D. C. J.: Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. Zbl. Bakt., II. Abt. 25, 30-63, (1910).

BENECKE, W.: Bau und Leben der Bakterien. Verlag B. G. Teubner, Leipzig und Berlin 1912.

BERGDOLT, E.: Über das Spiralwachstum von Oidium lactis. Arch. Mikrobiol. 2, 591-600 (1931).

BIERKOWSKI, E.: Die Glasfadenkapillartechnik. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 161, 89-91 (1954).

BIERKOWSKI, E.; HACKENTHAL, H.: Die Knöpfchenbildung der Paradiphtheriebakterien auf der Tellurplatte. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 160, 529-542 (1953/54).

BINGEL, K. F.: Eine Methode zur Herstellung von Sagittalschnitten durch Bakterienkolonien und ihre Unterlage. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 152, 248-252 (1947).

BISSET, K. A.: The structure of "rough" and "smooth" colonies. Journ. Path. Bact. 47, 223-229 (1938).

BISSET, K.A.: The cytology and life-history of bacteria. 2. Aufl.. Verlag E. A. Livingstone, Edinburgh 1955.

BLEUL, I.: Eine Sektorenvariante mit proliferierenden Sterigmen von Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom and Church. Arch. Mikrobiol. 44, 105-122 (1962).

BOAS, F.: Über Pilzkolonien mit spiraligem Wachstum. Zbl. Bakt., II. Abt. 49, 412 (1919).

BOGGS, Th.R.; PINCOFFS, M.C.: A method for the study of morphology and reproduction in filamentous organisms. John Hopkins Hosp. Bull. 26, 354-355 (1915).

BRUCKMAN, H.W.L.; ROOK, J.J.: On the suitability of gelatin for plate cultures. I. Antonie van Leeuwenhoek 19, 341-353 (1953).

BRUNSTETTER, B.L.; MAGOON, C.A.: Studies on bacterial spores. III. A contribution to the physiology of spore production in Bacillus mycoides. J.Bact. 24, 85-122 (1932).

BÜRGERS, HIRSCH: Variation oder Symbiose? Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 116, 436-441 (1930).

BURK, A.: Mutation bei einem der Koligruppe verwandten Bakterium. Arch.Hyg. 65, 235-242 (1908).

CHUNG, K.L.; HAWIRKO, R.Z.; ISAAK, P.K.: Cell wall replication. I. Cell wall growth of Bacillus cereus and Bacillus megaterium. Canad. J. Microbiol. 10, 43-48 (1964).

CLAUS, D.: Anreicherungen und Direktisolierungen aerober sporenbildender Bakterien. In: SCHLEGEL, H.G.; KRÖGER, E. (edit.) Symposium der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., Heft 1. Zbl.Bakt., I.Abt. Supplementheft 1 (1965).

COHN, F.: Untersuchungen über Bakterien. IV. Beiträge zur Biologie der Bacillen. Beitr.z.Biol.d.Pflanzen 2, 249-276 (1876).

COMBES, R.; KAUFFMANN, J.; VAZART, B.: Structure des colonies du Nocardia ivorensis. C.r.Acad. Sci. (Paris) 244, 1582-1587 (1957).

DARANYI, J.V.: Lytisches Ferment bei der Pseudobakteriophagie des Milzbrandes. Zbl.Bakt., I. Abt.Orig. 102, 326-329 (1927).

DOOREN de JONG, L.E. den: Studien über Bakteriophagie. I. Über Bac. megatherium und den darin anwesenden Bakteriophagen. II. Fortsetzung der Untersuchungen über den Megatherium-Bakteriophagen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 120, 1-23 (1931).

DUNHAM, E.K.: Der Einfluß physischer Bedingungen auf den Charakter von Kolonien auf Gelatineplatten. Referat: Zbl. Bakt., II. Abt. 10, 382 (1903).

EIJKMAN, C.: Über natürliche Wachstumshemmung der Bakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 41, 471-474 (1906).

EISENBERG, Ph.: Über sekundäre Bakterienkolonien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 40, 188-194 (1906).

EISENBERG, Ph.: Untersuchungen über die Variabilität der Bakterien. I. Mitt. Über sporogene und asporogene Rassen des Milzbrandbacillus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 63, 305-321 (1912).

EISENBERG, Ph.: Untersuchungen über die Variabilität der Bakterien. II. Mitt. Über sogenannte Mutationsvorgänge bei Choleravibrionen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 66, 1-19 (1912).

FELSENREICH, G.; TRAWINSKI, A.: Über die Bedeutung des Kolonietypus für die Bestimmung und Differenzierung der Bakterienarten der Koli-Typhusgruppe. Österr. Sanitätswesen 28, 1469-1509 (1916).

FETTING, R.: Untersuchungen über die L-Phase von Proteus vulgaris. Inaugural-Diss., Christian Albrechts-Univ. Kiel 1957.

FISCHER, A.: Vorlesungen über Bakterien. Verlag Gustav Fischer, Jena 1897.

FISCHL, R.: Ein neues Verfahren zur Herstellung mikroskopischer Präparate aus Reagenzglaskulturen. Fortschr. d. Med. 5, 663-666 (1887).

FLÜGGE, C.: Die Mikroorganismen. Teil I, 3. Aufl., Verlag F.C.W. Vogel, 1896.

FORTNER, J.: Die Mikroskopie der aeroben und anaeroben Oberflächenkolonien auf hängendem Agar. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 115, 96-99 (1930).

FORTNER, J.: Bildatlas lebender Bakterien. Verlag Transmare-Photo, Berlin 1951.

FRAENKEL, C.; PFEIFFER, R.: Mikrophotographischer Atlas der Bakterienkunde, 2. Aufl., Verlag A. Hirschwald, Berlin 1895.

GABY, W.L.: A study of the dissociative behavi our of Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 51, 217-234 (1946).

GARBOWSKI, L.: Über Abschwächung und Variabilität bei Bacillus luteus Smith u. Baker und Bacillus tumescens Zopf. Zbl. Bakt., II. Abt. 19, 641-655, 737-749 (1907); 20, 4-20, 99-113 (1908).

GERSBACH, A.: Über die Wendigkeit der Kolonieausläufer des Bacillus mycoides. (Isomerie bei Bakterien). Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 88, 97-103 (1922).

GIESBRECHT, P.: Die wichtigsten Feinstrukturen der Bakterien im elektronenmikroskopischen Bild. In: HENNEBERG, G. (edit.) Bildatlas pathogener Mikroorganismen. Bd. III. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart 1969.

GILLERT, K.-E.: Beobachtungen an wandernden Bakterienkolonien (Bac. circulans). Naturwiss. 43, 262 (1956).

GILLERT, K.-E.: Beobachtungen an wandernden Bakterienkolonien, Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 167, 599-600 (1957).

GILLERT, K.-E.: Bacillus circulans- Aufbau und Verhalten beweglicher Kolonien. Film E 183 der Encyclopaedia Cinematographica. Inst. f. d. Wiss. Film, Göttingen 1958.

GILLERT, K.-E.: Über das Verhalten von beweglichen Bakterienkolonien, dargestellt an einem Bacillus der Circulans-Gruppe. Med. Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin 1962.

GILLERT, K.-E.: Erläuterungen zu Photographien von wandernden Bakterienkolonien. In: HENNEBERG, G. (edit.) Bildatlas pathogener Mikroorganismen. Bd. II, 34-39 (1963). Verlag Gustav Fischer Stuttgart.

GILLERT, K.-E.: Polarisationsoptische Untersuchungen über die Struktur von Kolonien verschiedener Bakterienarten. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 189, 488-496 (1963).

GORDON, R.E.; RYNEARSON, T.K.: Maintenance of strains of Bacillus species. In: MARTIN, S.E. (edit.) Culture collections: perspectives and problems. University of Toronto Press 1963.

GOTSCHLICH, E.: Allgemeine Morphologie und Biologie der pathogenen Mikroorganismen. In: KOLLE, W.; KRAUS, R.; UHLENHUTH, P. (edit.) Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Bd. I.3. Aufl. Verlag Gustav Fischer, Jena, und Urban u. Schwarzenberg, Berlin u. Wien 1929.

GRAY, M.L.: A rapid method for the detection of colonies of Listeria monocytogenes. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 169, 373-377 (1957).

GRAY, M.L.; STAFSETH, H.J.; THORP Jr., F.: Colonial dissociation of Listeria monocytogenes. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 169, 378-391 (1957).

GREENE, H.C.: Colony organization of certain bacteria with reference to sporulation. J. Bact. 35, 261-273 (1938).

GRUMBACH, A.: Über Streptokokkenbakteriophagen und Dissoziationserscheinungen an Streptokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 118, 206-216 (1930).

GYÖRGY, P.: Beitrag zur Systematik der Paracoli-Bazillen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 84, 321-386 (1920).

HAAG, F.E.: Sphaerotilus natans Sack und Bac. viridi-glaucescens Sack. Zugleich ein Beitrag zur Variabilität des Bac. megatherium. Zbl. Bakt., II. Abt. 69, 4-14 (1927).

HACKENTHAL, H.; BIERKOWSKI, E.: Die Knöpfchenbildung auf selenhaltigen Platten als Mischinfektsymptom. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 161, 156-164 (1954).

HACKENTHAL, H.; BIERKOWSKI, E.: Kulturelle und serologische Analyse an drei hämolysierenden Streptokokkenstämmen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 162, 83-90 (1955).

HACKENTHAL, H.; BIERKOWSKI, E.: Kulturelle Analyse am Staphylococcus aures haemolyticus S.G. 511. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 162, 160-166 (1955).

HACKENTHAL, H.; BIERKOWSKI, E.: Eigenarten der Kolonieform als Symptome von Bakteriengemischen. In: HENNEBERG, G. (edit.) Bildatlas pathogener Mikroorganismen. Bd. I, 7-10 (1957), Verlag Gustav Fischer, Stuttgart.

HACKENTHAL, H.; BIERKOWSKI, E.: Studien über bakterielle Mischungen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 173, 431-461 (1958).

HARM, W.: Genetische Betrachtungen zur Frage der Reinheit von Bakterienkulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 162, 153-159 (1955).

HAWKER, L.E.; LINTON, A.H.; FOLKES, B.F.; CARLILE, M.G.: Einführung in die Biologie der Mikroorganismen. Verlag Georg Thieme, Stuttgart 1962.

HEIDER, A.: Über die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel bei erhöhter Temperatur. Arch. Hyg. 15, 341-368 (1892).

HENNEBERG, G.: Über die Feinstruktur der Bakterienkolonie. Sitzungsber. d. Österr. Ges. f. Hygiene und Mikrobiologie, Sept. 1954. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 156, 170-171 (1955).

HENNEBERG, G.: Sagittalschnitte von Bakterienkolonien. In: HENNEBERG G. (edit.) Bildatlas pathogener Mikroorganismen. Bd. I, 11-15 (1957). Verlag Bild und Forschung, Berlin.

HENNEBERG, G.: Feinstrukturen von Bakterienkolonien. (Vortrag bei der 6. Tagung der Österr. Ges. f. Mikrobiologie und Hygiene a.d. Semmering, 26.2.1958). Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 169, 347 (1958).

HENNEBERG, G.: Studien über den Aufbau von Bakterienkolonien. Vortrag vor der Ges. Naturforschender Freunde zu Berlin, 5.7.1960.

HENNEBERG, G.; MARWITZ, R.: Über die Struktur von Bakterienkolonien (Referat). Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 187, 43-68 (1963).

HENNEBERG, G.; VOSS, H.; LEWICKI, B.: Sagittalschnitte von Mykobakterienkolonien. In: HENNEBERG, G. (edit.) Bildatlas pathogener Mikroorganismen. Bd. II, 40-42 (1963). Verlag Gustav Fischer, Stuttgart.

HENNEBERG, F.; WATERSTRAAT, W.: Methoden der quantitativen Streptomycin- und Aureomycinbestimmung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 156, 258-268 (1950/51).

HENNEBERG, G.; WOLFF, I.: Über den Aufbau der Basalschicht von Bakterienkolonien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 189, 77-87 (1963).

HENRICI, A.: The biology of bacteria. Verlag D.C. Heath & Co., New York 1934.

HENRY, B.S.: Dissociation in the genus Brucella. Journ. Inf. Dis. 52, 374-402 (1933).

HIRSCH, J.: Die Bakterienpopulation als Biologische Einheit. Klin. Wschr. 12, 191-192 (1933).

HOLZMÜLLER, K.: Die Gruppe des Bacillus mycoides Flügge. Ein Beitrag zur Morphologie und Physiologie der Spaltpilze. Zbl. Bakt., II. Abt. 23, 304-354 (1909).

HUNT, D.E.; PITTILO, R.F.: Killing of cells in bacterial colonies. Appl. Microbiol. 15, 334-339 (1967).

HUTCHINSON, H.B.: Über Form und Bau der Kolonien nieder Pilze. Zbl. Bakt., II. Abt. 17, 65-74, 129-136, 321-330, 417-427, 533-604 (1907).

JACOBI, E.: Härtung und Färbung von Plattenkulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. 3, 536-538 (1888).

JANKE, A.: Studien über die Essigbakterienflora von Lagerbieren des Wiener Handels. Zbl. Bakt., II. Abt. 45, 1-50 (1916).

JENTSCH, K.D.: Zur Technik der Schrägdurchleuchtung von Plattenkulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 183, 410-416 (1962).

JUNGHANS, R.: Die Biologie der aeroben Bacillen aus der Sphaericus-Gruppe. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 160, 585-598 (1953/54).

KAFFKA, A.: Zur Morphologie des Milzbrandbacillus unter der Einwirkung von Antibiotika. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 163, 333-341 (1955).

KAHN, M.C.; NONIDEZ, F.J.: The role of non-acid fast rods and graules in the developmental cycle of the tubercle bacillus. Amer. Rev. Tuberc. 34, 361-383 (1936).

KAPLAN, R.W.: Neue Entwicklungen in der Mikrobengenetik. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 160, 181-193 (1953/54).

KAPLAN, R.W.: Gegenwärtige Probleme der Genetik der Mikroorganismen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 176, 236-239 (1959).

KLOPOTEK, A.v.: Über die Drehrichtung einiger Stämme von Bacillus cereus var. mycoides. Zbl. Bakt., II. Abt. 123, 683-684 (1969).

KNAYSI, G.: The endospore of bacteria. Bact. Rev. 12, 19-77 (1948).

KNIGHT, B.C.J.G.; PROOM, H.: A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus Bacillus. J. gen. Microbiol. 4, 508-538 (1950).

KOCH, R.: Untersuchungen über Bakterien. V. Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf der Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 2, 277-308 (1876).

KOLLATH, W.: Zur Diagnose der "Dysbakterie" des Darmes. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 161, 501-503 (1954).

KORINEK, J.: Zur Biologie der Bakterienkolonie. Zbl. Bakt., II. Abt. 91, 184-195 (1934/35).

KRASSILNIKOV, N.A.: Diagnostik der Bakterien auf Actinomyceten. Verlag VEB Gustav Fischer, Jena 1959.

KRÖGER, E.: Experimentelle Untersuchungen zum morphologischen S/R- und antigenen O/o-Formenwechsel gramnegativer Darmbakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 160, 242-250 (1953/54).

LEGROUX, R.; MAGROU, J.: Etat organisé de colonies bactériennes. Ann. Inst. Past. 34, 417-431 (1920).

LEITNER, N.: Eine regelmäßige Variantenbildung durch Bakteriophagen und die Erklärung durch das Prinzip der Aussiebung (Selektion). Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 116, 442-449 (1930).

LEWICKI, B.: Darstellung der Feinstruktur von Tuberkelbakterienkolonien der Typen H 37 Rv; H 37 Ra; BCG; Ravenel; Gallinaceus im Sagittalschnitt. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 172, 551-572 (1958).

LEWIS, I.M.: Dissociation and life cycle of Bacillus mycoides. J. Bact. 24, 381-421 (1932).

LEWIS, I.M.: Secondary colonies of bacteria with special reference to Bacillus mycoides. J. Bact. 25, 359-387 (1933).

LEWIS, I.M.: Bacterial variation with special reference to behavior of some mutabile strains of colonbacteria in synthetic media. J. Bact. 28, 619-638 (1934).

LIESKE, R.: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (Actinomyceten). Verlag Gebr. Borntraeger, Leipzig 1921.

LURIA, S.E.; DELBRÜCK, M.: Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 28, 491-511 (1943).

MASSINI, R.: Über einen in biologischer Beziehung interessanten Kolistamm (Bact. coli mutabile). Ein Beitrag zur Variation der Bakterien. Arch. Hyg. 61, 250-292 (1907).

MÜLLER, R.: Mutationen bei Typhus- und Ruhrbakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 58, 97-106 (1911).

MÜLLER, R.: Medizinische Mikrobiologie. 4. Aufl. Verlag Urban und Schwarzenberg, München-Berlin 1950.

MÜLLER-THURGAU, H.: Bakterienblasen (Bakteriocysten). Zbl. Bakt., II. Abt. 20, 353-400, 449-468 (1908).

MÜNDEN, H.: Vierter Beitrag zur Zytoblastenfrage. Zbl. Bakt., II. Abt. 5, 398, 447, 490 (1898).

MUTO, T.: Über Bacillus helixiodes, ein neuer wandernder Bazillus mit wandernder Kolonie. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 35, 331 (1904).

NEISSER, A.: Mikroskopische Schnittpräparate aus Reagenzglaskulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. 3, 506-510 (1888).

NEISSER, I.M.: Ein Fall von Mutation nach de Vries bei Bakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 38, Beiheft, 98 (1906).

NEUMANN, H.: Die Isolierung und die Entwicklung von Anaerobiersporen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 115, 100-108 (1930).

NOWAK, J.: Documenta Microbiologica. 1. Teil: Bakterien. Verlag Gustav Fischer, Jena 1927.

NUNGESTER, W.J.: Dissociation of B. anthracis. J. Inf. Dis. 44, 73-125 (1929).

OESTERLE, P.; STAHL, C.A.: Untersuchungen über den Formenwechsel und die Entwicklungsformen bei Bacillus mycoides. Zbl. Bakt., II. Abt. 79, 1-25 (1929).

OLSEN, O.: Untersuchungen über den Pfeifferschen Influenzabacillus während der Grippepandemie 1918-1920. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 84, 497-513 (1920).

ORSOS, F.: Die Form der tiefliegenden Bakterien- und Hefekolonien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 54, 289-328 (1910).

PELZER, H.: Zellwandstruktur bei Bakterien. In: WIELAND, Th., PFLEIDERER, G. (edit.) Molekularbiologie, Bausteine des Lebendigen. Umschau Verlag, Frankfurt/M. 1967.

PEROLD, A.J.: Untersuchungen über Weinessigbakterien. Zbl. Bakt., II. Abt. 24, 13-55 (1909).

PESCH, K.L.: Milzbrand-Pseudobakteriophagen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 93, 525-528 (1924).

PICK, X.: Beiträge zur Morphologie des Staphylococcus albus. Berl. Klin. Wschr. 1900, 1040-1041.

PIEKARSKI, G.: Über kernähnliche Strukturen bei Bacillus mycoides Flügge. Arch. Mikrobiol. 11, 406-413 (1940).

POETSCHKE, G.: Zur bakteriologischen Schnelldiagnose aus dem Liquor cerebrospinalis. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 169, 474-491 (1957).

POETSCHKE, G.: Kinematographisches Studien über Bewegungsvorgänge bei Proteus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 172, 421-432 (1958).

POWELL, J.F.: Isolation of dipicolinic acid from spores of Bacillus megaterium. Biochem. J. 54, 210-211 (1953).

POWELL, J.F.; STRANGE, R.E.: Biochemical changes occuring during the germination of bacterial spores. Biochem. J. 54, 205-209 (1953).

PREISZ, H.: Studien über Morphologie und Biologie des Milzbrandbazillus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 35, 280-293, 416-434, 537-545, 657-665 (1904).

PREISZ, H.: Studien über das Variieren und das Wesen der Abschwächung des Milzbrandbacillus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 58, 510-565 (1911).

PRELL, H.: Die Individualitätsverhältnisse bei den Bakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 124, 208-216 (1932).

PRINGSHEIM, E.: Über Kolonien mit Wachstum in einseitwendigen Spiralen. Zbl. Bakt., II. Abt. 48, 513-515 (1918).

PRINGSHEIM, E.; LANGER, J.: Zur Entwicklungsphysiologie der Kolonien des Bacillus mycoides Flügge. Zbl. Bakt., II. Abt. 61, 225-246 (1924).

PRITTWITZ u. GAFFRON, J.v.: Untersuchungen über Struktur von S- und R-Formen bei gramnegativen Darmbakterien mit dem Phasenkontrastmikroskop. Arch. Hyg. 136, 218-225 (1952).

REITER, R.: Über die Gewinnung resistenter Milzbrandsporen. Arch. Hyg. 89, 181-201 (1920).

RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. 3. Aufl. Verlag J. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

ROELCKE, K.; BARTRAM, W.: Über die Wuchsformen des Bacterium proteus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 143, 247-252 (1938/39).

ROELCKE, K.; INTLEKOFER, H.: Untersuchungen über die verschiedenen Wuchsformen eines Enteritiserregers. Zbl. Bakt., I. Abt., Orig. 142, 42-51 (1938).

ROOK, J.J.; BRUCKMAN, H.W.L.: On the suitability of gelatin for plate cultures. II. Antonie van Leeuwenhoek 19, 354-362 (1953).

ROSENTHAL, W.: Beobachtungen über die Variabilität der Bakterienverbände und der Kolonieformen unter verschiedenen physikalischen Bedingungen. Dtsch. Arch. f. klin. Med. 55, 513-530 (1895).

SAUL, E.: Beiträge zur Morphologie des Staphylococcus albus. Hyg. Rdsch. 10, 575 (1900).

SAUL, E.: Beiträge zur Morphologie des Staphylococcus albus. Berl. klin. Wschr. 1900, 1058-1060.

SAUL, E.: Beiträge zur Morphologie des Typhusbazillus und des Bacterium coli commune. Berl. klin. Wschr. 1901, 1244-1248.

SAUL, E.: Beiträge zur Morphologie der pathogenen Bakterien. Dtsch. Med. Wschr. 31, 41 (1905).

SAUL, E.: Beiträge zur Morphologie der pathogenen Mikroorganismen. Diphtherie- und Pseudodiphtheriebazillus. Münch. Med. Wschr. 1905, 446.

SCHÄFER, E.; DITTES, G.: Die Verwendung des Kryostaten nach Dittes-Duspiva bei der Herstellung von Sagittalschnitten durch Bakterien- und Sproßpilzkulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 174, 616-624 (1959).

SCHARIKOWA, G.G.; SAWTSCHENKO, G.W.; MITRONOWA, T.N.: Die Dissoziationsformen von Bacillus brevis var. G.B., Mikrobiologia, 33, 605-609 (1964).

SCHARIKOWA, G.G.; MAKAROWA, G.J.; POGLASOWA, M.N.; SARUBINA, A.P.: Die Bildung und Entwicklung von Kolonien der Dissoziationsformen des Bacillus brevis var. G.B., Mikrobiologia 35, 647-650 (1966).

SCHLEGEL, H.G.: Methoden der Anreicherung und Isolierung von Mutanten. In: SCHLEGEL, H.G.; KRÖGER, E. (edit.) Symposium der Dtsch. Ges. für Hygiene und Mikrobiologie e.V., Heft 1. Zbl. Bakt., I. Abt., Supplementheft 1 (1965).

SCHNEWEIS, K.-E.: Zur Mikromorphologie glatter und rauher Enterobacteriaceen-Kulturen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 176, 71-83 (1959).

SCHUBERT, O.: Über Koloniebildung der Bakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 84, 1-12 (1920).

SCHUSSNIG, B.: Handbuch der Protophytenkunde. Bd. II. Verlag VEB Gustav Fischer, Jena 1960.

SERKOWSKI, St.: Über den Bau der Bakterienkolonien. Zbl. Bakt., II. Abt. 7, 391 (1901).

SLEPECKI, R.; FOSTER, J.W.: Alternation in metal contant of spores of Bacillus megaterium and the effect on some spore properties. J. Bact. 78, 117-123 (1959).

SMITH, N.R.; GORDON, R.E.; CLARK, F.E.: Aerobie sporeforming bacteria. Agricult. Monograph No. 16, U.S. Dept. of Agriculture (1952).

SOULE, M.H.: Microbic dissociation. 1. B. subtilis. J.Inf.Dis. 42, 93-148 (1928).

STAPP, C.; ZYCHA, H.: Morphologische Untersuchungen an Bacillus mycoides, ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. Arch. Mikrobiol. 2, 493-535 (1931).

STÖSS, B.: Darstellung der Feinstruktur von Bakterienkolonien im Sagittalschnitt. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 162, 386-400 (1955).

STOLP, H.: Über die spontane Mutation von Phagenresistenz nach Phagensensibilität. Arch. Mikrobiol. 31, 262-273 (1958).

STÜVEN, K.: Beiträge zur Physiologie und Systematik sulfatreduzierender Bakterien. Arch. Mikrobiol. 35, 152-180 (1960).

STUNKAT, R.: Untersuchungen über die Knopfbildung bei Salmonella- Kulturen unter besonderer Berücksichtigung der Unterscheidung zwischen Paratyphus B- und Enteritiserregern. Inaugural-Diss., Med. Fak. der Freien Universität Berlin, 1961.

THIMANN, K.V.: Das Leben der Bakterien. Verlag VEB Gustav Fischer, Jena 1964.

THOM, C., RAPER, K.B.: A manual of the Aspergilli. Verlag Williams & Williams Co., Baltimore 1945.

TRUFFAUT, G.; BEZSSONOFF, N.: La sterilisation partielle ou désinfektion du sol. Ses effets et leurs causes. Sci. Sol (Truffaut) 1, 3-61 (1922).

ÜCKERT, H.: Beitrag zur Systematik der Dermatophyten. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 176, 102-156 (1959).

ULBRICH, F.: Mikrophotographie lebender Bakterien bei Hellfeldbeleuchtung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 161, 85-88 (1954).

ULBRICH, F.: Mikrokultur der Bakterien und ihre Bedeutung für die bakteriologische Praxis, Lehre und Forschung, Zbl. Bakt., I. Abt, Orig. 162, 479-486 (1955).

ULBRICH, F.: Darstellung lebender selektiv vital gefärbter Bakterien in der Deckglaskultur. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 163, 546-548 (1955).

ULBRICH, F.: Vitalfärbung der Dissoziationsformen von Bakterienkulturen in der Mikro- und Makrokultur. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 169, 221-222 (1957).

WAGNER, G.: Beiträge zur Kenntnis der Milzbrand- und milzbrandähnlichen Bazillen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 84, 386-396 (1920).

WAGNER, M.: Studien mit fluoreszierenden Antikörpern an wachsenden Bakterien. I. Die Neubildung der Zellwand bei Diplococcus pneumoniae. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 195, 87-93 (1964/65).

WAGNER, M.; UNGER, H.: Anfärbung von Bakterienkolonien mit fluoreszierenden Antikörpern. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 189, 482-487 (1963).

WAKSMAN, S.A.: The Actinomycetes. The Ronald Press Company, New York 1967.

WILSON, G.S.; MILES, A.A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. 5. Aufl., Edward Arnold (Publ.) Ltd., London 1964.

WINKLER, A.: Die Bakterienzelle. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart 1956.

WINKLER, A.: Systematik und Morphologie der Bakterien. In: REPLOH, H., OTTE, H.J. (edit.) Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie und Hygiene. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart 1961.

ZIKES, H.: Über abnorme Koloniebildungen bei Hefen und Bakterien. Zbl. Bakt., II. Abt. 46, 1-4 (1916).

ZOPF, W.: Die Spaltpilze. Verlag Ed. Trewendt, Breslau 1883.

ZOSEL, O.: Zur Biologie des Schweinerotlaufbazillus. II. Wien. Tierärztl. Mschr. 9, 408-41 (1922).

Dem Präsidenten des Bundesgesundheitsamtes, Herrn Professor Dr. Georg H e n n e b e r g , möchte ich meinen herzlichen Dank für die Anregung zu dieser Arbeit aussprechen, die stete und förderliche Anteilnahme an deren Fortgang und die großzügige Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung der Untersuchungen im Robert Koch-Institut.

Gleichfalls gilt dem Direktor des Botanischen Gartens und Museums Berlin, Herrn Professor Dr. Theo E c k a r d t , mein verbindlicher Dank für sein freundliches Entgegenkommen und die Förderung meiner Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 5. Juni 1935 wurde ich, Fritz Rainer M a r w i t z als Kind des Steuerberaters Erich Marwitz und dessen Ehefrau Lottchen Marwitz geb. Weiße in Leipzig-Thonberg geboren.

Vom Herbst 1941 bis zum Herbst 1945 besuchte ich die 27. Volksschule in Leipzig. Da zu dieser Zeit keine 5. Oberschulklassen mehr gebildet wurden, mußte ich ein Schuljahr überspringen und ging über in die 6. Klasse der Humboldt-Oberschule in Leipzig. Dort bestand ich im Juni 1952 die Reifeprüfung.

Im Herbst 1952 mußte ich mich an der Pädagogischen Fakultät der Universität Leipzig für die Fachrichtung Biologie/Chemie immatrikulieren lassen, da mir das Biologiestudium an der Math.-Nat. Fakultät verwehrt wurde. Dort studierte ich 4 Semester bis zum Herbst 1954 und verlegte nach der Exmatrikulation meinen Wohnsitz nach West-Berlin.

Hier mußte ich ab Oktober 1954 den Sonderlehrgang für Abiturienten besuchen, um im August 1955 die Anerkennungsprüfung für das Reifezeugnis der Sowjetischen Besatzungszone Deutschlands abzulegen.

Am 18. November 1955 wurde ich an der Math.-Nat. Fakultät der Freien Universität Berlin für die Fachrichtung Zoologie immatrikuliert. Im Wintersemester 1959/60 wechselte ich imHinblick auf einen angestrebten Abschluß meines Studiums mit einer mikrobiologischen Arbeit auf die Fachrichtung Botanik über und legte im Mai 1960 die Vorprüfung zur Diplomprüfung in Biologie ab. Da zu dieser Zeit keine Möglichkeit bestand, am Pflanzenphysiologischen Institut eine Doktorarbeit zu beginnen, wurde mir diese im Robert Koch-Institut Berlin gegeben, wo ich zuerst als Volontär tätig war.

Seit 1967 bin ich mit Dorothea Marwitz, geb. Luckow verheiratet.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33, Garystr. 45